

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ALLINY CRISTINY DA SILVA BASTOS

**ANÁLISE DE VEGF-C, COX-2 E IL-17A COMO
BIOMARCADORES DO CARCINOMA EPIDERMÓIDE
DE CABEÇA E PESCOÇO**

VITÓRIA

2017

ALLINY CRISTINY DA SILVA BASTOS

**ANÁLISE DE VEGF-C, COX-2 E IL-17A COMO
BIOMARCADORES DO CARCINOMA EPIDERMÓIDE
DE CABEÇA E PESCOÇO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof^a Dr^a Sonia Alves Gouvea

VITÓRIA

2017

ALLINY CRISTINY DA SILVA BASTOS

**ANÁLISE DE VEGF-C, COX-2 E IL-17A COMO
BIOMARCADORES DO CARCINOMA
EPIDERMÓIDE DE CABEÇA E PESCOÇO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Apresentada em 23 de fevereiro de 2017.

Prof^a. Dr^a. Sonia Alves Gouvea
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora

Prof. Dr. Marco Cesar Cunegundes Guimarães
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof^a. Dr^a. Hérica de Lima Santos
Universidade Federal de São João del Rei

VITÓRIA

2017



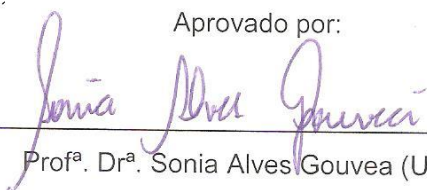
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

"Análise de VEGF-C, COX-2 e IL-17A como Biomarcadores do Carcinoma
Epidermóide de Cabeça e Pescoço"

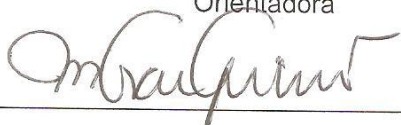
Alliny Cristiny da Silva Bastos

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para a obtenção do
título de Mestre em Biotecnologia.

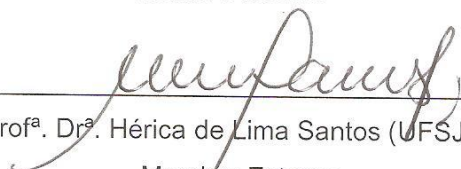
Aprovado por:


Profª. Drª. Sonia Alves Gouveia (UFES)

Orientadora


Prof. Dr. Marco Cesar Cunegundes Guimarães (UFES)

Membro Interno


Profª. Drª. Hérica de Lima Santos (UFSJ)

Membro Externo

Vitória-ES, 23 de Fevereiro de 2017.

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade
Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

B327a Bastos, Alliny Cristiny da Silva, 1991 -
Análise de VEGF-C, COX-2 e IL-17A como biomarcadores
do carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço / Alliny Cristiny
da Silva Bastos - 2017.
74 f. : il.

Orientador: Sônia Alves Gouvêa.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Carcinoma de Células Escamosas. 2. Cabeça.
3. Pescoço. 4. Biomarcadores. I. Gouvêa, Sônia Alves.
II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências
da Saúde. III. Título.

CDU: 61

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado a oportunidade de estar onde estou, por cada pessoa que colocou em meu caminho e por me ajudar a levantar a cada vez que cai.

Ao meu Santo Expedito e Nossa Senhora pela intercessão e proteção.

A todos pacientes que fizeram parte deste projeto. Obrigada por me ensinarem a ser mais humana e grata. Dedico este trabalho e meus esforços a cada um de vocês.

Aos meu pais, Sônia e Ernandes, pelo amor incondicional e pelas incessantes orações para que eu seja feliz. Vocês são tudo que tenho nessa vida e toda conquista é fruto de vocês.

Ao meu irmão Gabriel, que mesmo distante nunca me desamparou, por me dar tanto orgulho, pela amizade e por me fazer rir sempre. Você é minha maior saudade.

Ao Fady, meu companheiro da vida. Obrigada pelo apoio diário, por incentivar meus sonhos e acreditar mais em mim do que eu mesma. Obrigada acima de tudo por sua paciência e disposição em me ajudar.

Agradeço minha orientadora, Dra. Sonia Gouvêa, que desde o início desta jornada teve total confiança em meu trabalho e no meu potencial. Obrigada pela oportunidade de fazer parte desse projeto, pelos conselhos, por aguentar meu choro e pela liberdade de sempre poder conversar com você.

À Dra. Sandra Ventorin pelo trabalho realizado em parceria no Hospital Santa Rita de Cássia e HUCAM. Agradeço ainda todos alunos de pós-graduação e iniciação científica do Laboratório de Patologia Molecular que colaboraram de alguma forma com o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Laboratório de Neurobiologia Molecular e Comportamental. Obrigada Dra. Rita Gomes e Dra. Cristina Martins por me receberem com tamanha boa vontade e por me auxiliarem na parte mais complexa deste trabalho. A todos os alunos de pós-

graduação e iniciação científica deste laboratório por terem me acolhido com carinho, pela amizade e pela ajuda nos experimentos.

Em especial gostaria de agradecer a pós-doc Dra. Alice Laschuk por ter sido minha consultora científica, por responder minhas perguntas (que por sinal não foram poucas), por me guiar em um caminho que eu desconhecia, por me mostrar seu amor pela ciência e por ser esse grande exemplo de pessoa e profissional.

Ao Laboratório de Biologia Molecular, ao Dr. Roger Lyrio, Dra. Nazaré Bissoli e a todos os alunos que dividiram o laboratório durante a árdua tarefa do blotting.

Aos professores e técnicos do Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares CCS/UFES por permitirem o uso dos equipamentos.

A toda equipe do Hospital Santa Rita de Cássia e HUCAM, por permitirem o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Dr. Agenor Sena, por abrir as portas do seu consultório no Hospital Santa Rita de Cássia e pela disponibilidade em ajudar.

Agradeço aos colegas “filhos” da Sônia, Celeny, Marcela, Karine, Barbara, Iasmim, João, Vinícius, Danielle e Helena, pelo apoio e pela contribuição durante o desenvolvimento deste projeto.

A minha latina preferida, Celeny, por compartilhar comigo as dores e alegrias durante essa jornada, por sua amizade e pelas oportunidades que você me mostrou.

A Mirla e Jana, pela amizade, lamentações e conversas que compartilhamos.

A todos meus amigos que estão distantes geograficamente, mas que sempre estiveram ao meu lado quando precisei.

Aos colegas, professores e secretários do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Às agências fomento CAPES e FAPES, que através do edital 007/2014 nos deu suporte financeiro, e a Universidade Federal do Espírito Santo.

RESUMO

O carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CECP) apresenta alta taxa de mortalidade e morbidade de indivíduos em todo o mundo. Apesar de diversos estudos apresentarem possíveis biomarcadores (BM) para o CECP, não há um BM específico estabelecido para esta doença. O objetivo deste trabalho foi avaliar o papel do VEGF-C, COX-2 e IL-17A como possíveis BM do CECP, uma vez que sua sobreexpressão tem sido relacionada com o pior prognóstico da doença. Foi realizado um estudo clínico transversal aprovado pelo Comitê de Ética CEP/UFES nº 99.242/2012. Dados clínicos-patológicos e amostras biológicas de 124 pacientes com CECP e 29 indivíduos saudáveis foram coletados. A detecção da expressão do mRNA de VEGF-C e COX-2 foi realizada por ensaio de qPCR em amostras de tumor e tecido normal. A avaliação da expressão proteica de VEGF-C e COX-2 foi realizada em soro de pacientes com CECP e controles por western blotting. O nível de IL-17A (pg/ml) foi mensurado por citometria de fluxo. A análise estatística dos dados mostrou aumento da expressão relativa do mRNA de VEGF-C em tecido tumoral foi observada em pacientes com metástase em linfonodos ($p=0,027$), em relação ao grupo sem envolvimento linfonodal ($0,043$) e as amostras de tecido normal ($0,031$); Alteração da expressão proteica de VEGF-C em soro de pacientes com CECP em estágio avançado da doença (III/IV) ($p=0,01$) foi observado em comparação com grupo em estadiamento inicial (I/II) ($p=0,03$) e controle ($p=0,003$). COX-2 não apresentou diferença significativa em nenhum dos parâmetros e tipos de amostras biológicas analisadas. O nível de IL-17A mostrou-se elevado nas amostras de soro de pacientes com CECP ($p=0,04$), no estadiamento inicial da doença (I/II) ($p=0,03$), em tabagistas ($p=0,04$) e nos indivíduos sem metástase em linfonodos regionais quando comparados ao grupo controle ($p=0,04$). VEGF-C e IL-17A se mostraram como potenciais BM do CECP em amostras de soro, sendo uma forma menos invasiva e mais viável para avaliação do estado do paciente, enquanto que para COX-2 são necessárias novas abordagens para avaliar seu papel no CECP.

Palavras-chave: Carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço; biomarcadores; VEGF-C; COX-2; IL-17A.

ABSTRACT

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is one of the most frequent types of cancers presenting a high mortality rate and morbidity rate for individuals worldwide. Although several studies present possible biomarkers (BM) for HNSCC there is no specific BM established for this disease. The objective of this work was to evaluate the role of VEGF-C, COX-2 and IL-17A as possible BM of HNSCC, since their high expression has been related to a worse prognosis of the disease. A cross-sectional clinical study, approved by the CEP/UFES Ethics Committee n°99.242/2012, was performed. Biological samples and clinical-pathological data from 124 patients with HNSCC and 29 healthy individuals were collected. The detection of VEGF-C mRNA and COX-2 expression was performed by qPCR trials on tumor tissues and normal tissue samples. The evaluation of VEGFC and COX2 protein expression was performed with serum from both HNSCC patients and a control group by Western blotting. The level of IL-17A (pg/ml) was measured by flow cytometry. Increased relative expression of VEGF-C mRNA in tumor tissue was observed in patients with lymph node metastasis ($p=0,027$) compared to without lymph node metastasis ($p=0,043$) and normal tissue samples ($p=0,031$); Variation of VEGF-C expression in serum of patients in advanced stages of the disease (III/IV) was observed ($p=0,01$) in comparison with patients in initial stages (I/II) ($p = 0,03$) and also the control group ($p=0,003$). COX-2 did not present a significant difference in any of the parameters of the biological samples analyzed. The level of IL-17A was higher in the serum samples from patients in the initial stages of HNSCC (I/II) ($p=0,03$), in smokers with the disease ($p=0,04$) and in those without regional lymph node metastases ($p=0,04$) when compared to the control group. VEGF-C and IL-17A were shown to be potential biomarker of HNSCC in serum samples, being a less invasive and more feasible way to evaluate the patient's condition, whereas for COX-2 new approaches are necessary to evaluate its role in HNSCC.

Keywords: Head and Neck Squamous Cell Carcinoma; Biomarkers; VEGF-C; COX-2; IL-17A.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Caminho das células tumorais metastáticas no sistema linfático.....	20
Figura 2 - Invasão de células tumorais através de vasos linfáticos induzido por VEGF-C.....	21
Figura 3 - Ação da COX-1 e COX-2 frente a estímulos recebidos pelas células.....	24
Figura 4 - Papel da COX-2 e prostaglandinas na inflamação induzida na carcinogênese e os principais tipos de respostas gerados	26
Figura 5 - Receptores da família de citocinas IL-17 e sua interação com os respectivos receptores.	29
Figura 6 - Visão geral da atividade pró e anti-tumorigênica da IL-17A	30
Figura 7 - Avaliação da expressão relativa do mRNA de VEGF-C e COX-2 por qPCR com gene normalizador β -actina pelo método $\Delta\Delta Ct$	47
Figura 8 - Expressão relativa do mRNA de VEGF-C em amostras de tumor de pacientes com metástase em linfonodos regionais (N+) em relação a pacientes sem envolvimento linfonodal (N0) e amostras de tecido normal (controle).....	48
Figura 9 - Avaliação da expressão proteica de VEGF-C em soro de pacientes com CECP e controles.....	57
Figura 10 - Avaliação do nível de IL-17A em soro de pacientes com CECP e controles.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência de primers forward e reverse de VEGF-C, COX-2 e β -Actina	37
Tabela 2 - Características clínicas da população analisada	45
Tabela 3 - Avaliação da expressão relativa do mRNA de VEGF-C em relação aos dados clínicos-patológicos dos pacientes em tecido tumoral e normal	51
Tabela 4 - Avaliação da expressão relativa do mRNA de COX-2 em relação aos dados clínicos-patológicos dos pacientes em tecido tumoral e normal (controle).....	52
Tabela 5 - Expressão proteica de VEGF-C em soro em relação aos dados clínicos-patológicos dos pacientes com CECP e controles	58
Tabela 6 - Expressão proteica de COX-2 em soro em relação aos dados clínicos-patológicos dos pacientes com CECP e controles	59
Tabela 7 - Avaliação do nível de IL-17A em relação aos dados clínicos-patológicos dos pacientes com CECP e controles	64

LISTA DE SIGLAS

AINEs	Anti-inflamatórios não esteroides
BM	Biomarcadores
BSA	Albumina sérica bovina (do inglês Bovine serum albumin)
CCP	Câncer de Cabeça e Pescoço
CECP	Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês Deoxyribonucleic acid)
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral- α (do inglês Tumoral necrosis factor- α)
HPV	Papilomavírus Humano (do inglês <i>Human Papillomavirus</i>)
IL-17A	Interleucina-17A
HUCAM	Hospital Universitário Cassiano Antonio de Moraes
INCA	Instituto Nacional do Câncer
PSA	Antígeno prostático específico (do inglês Prostate specific antigen)
PVDF	Membrana de fluoreto de polivinilideno
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (do inglês Real time quantitative polymerase chain reaction)
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês Ribonucleic acid)
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular (do inglês Vascular endothelial growth factor)

LISTA DE SIGLAS

VEGFR Receptor do fator de crescimento endotelial vascular (do inglês Vascular endothelial growth factor receptor)

PIGF Fator de Crescimento placentário (do inglês Placental growth factor)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	Contextualização do Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço	14
1.2	Fatores de Risco.....	15
1.3	Biomarcadores	17
1.3.1	VEGF-C.....	18
1.3.2	COX-2	24
1.3.3	IL-17A	28
2	OBJETIVOS	33
2.1	Objetivo Geral	33
2.2	Objetivos Específicos	33
3	METODOLOGIA	34
3.1	Aprovação Pelo Comitê de Ética e Perfil Clínico-Epidemiológico	34
3.1.1	Perfil Clínico-Epidemiológico	34
3.1.2	Obtenção de Amostras Biológicas.....	35
3.2	Análise da Expressão Gênica por qPCR	35
3.2.1	Extração de RNA Total	36
3.2.2	Desenho de Primers	36
3.2.3	Síntese de cDNA.....	37
3.2.4	PCR Quantitativo Em Tempo Real.....	37
3.3	<i>Western Blotting</i>	38
3.3.1	Quantificação das Proteínas	38
3.3.2	<i>Limpeza da albumina das amostras de soro</i>	39
3.3.3	<i>Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE)</i>	39
3.3.4	<i>Transferência de Proteínas para a Membrana</i>	41
3.3.5	<i>Imunoblotting</i>	41
3.3.6	<i>Revelado e Análise das Membranas</i>	42
3.4	Citometria de Fluxo	43
3.5	Análise Estatística	43
4	RESULTADOSE DISCUSSÃO	44
4.1	Expressão relativa do mRNA de VEGF-C e COX-2 em Tecido Tumoral e Tecido	

SUMÁRIO

	Normal de Pacientes com CEC	46
4.2	Análise da Expressão Proteica de VEGF-C e COX-2 em Soro de Pacientes com CEC e Controles	54
4.3	Avaliação do Nível de IL-17A em Soro de Pacientes com CEC e Controles	60
5	CONCLUSÕES	65
6	REFERÊNCIAS	66
7	ANEXOS	73

1 INTRODUÇÃO

1.1 Contextualização do Câncer de Cabeça e Pescoço

O câncer é considerado atualmente o maior problema de saúde pública mundial (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2015). Nas últimas décadas a população apresentou uma mudança significativa em seus hábitos de vida com o aumento da ingestão de bebidas alcoólicas, drogas e a exposição a substâncias xenobióticas, o que contribuiu para o aumento da incidência desta doença (WEIDERPASS, 2010). De acordo com a estimativa do INCA (2016), espera-se para o biênio 2016/2017 a ocorrência de 600 mil novos casos de câncer somente no Brasil.

O câncer de cabeça e pescoço (CCP) corresponde a um conjunto heterogêneo de neoplasias que acometem a região da cabeça e pescoço e está entre os cânceres mais frequentes no mundo (PAI; WESTRA, 2009). Os sítios anatômicos que estão incluídos nesse grupo de neoplasias constituem a cavidade oral; faringe; orofaringe; cavidade nasal e seios paranasais; laringe; e glândulas (COLOMBO, 2009). O principal tipo histológico do CCP é o carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CECP), com origem no epitélio de revestimento, correspondendo a cerca de 90% dos casos da doença (LIU et al., 2017).

Apesar dos avanços recentes na terapêutica contra o câncer, a mortalidade relacionada ao CCP permanece elevada (SVIDER et al., 2017). Para 2012 foram estimados 700 mil novos casos de CCP no mundo com uma taxa de mortalidade de 375 mil pessoas pela doença. Até 2030 é previsto um aumento de 34% da doença com expectativa de mais de 1 milhão de novos casos e quase 600 mil óbitos (FERLAY et al., 2014). Além disso, a maioria dos pacientes recebe diagnóstico em estágio tardio da doença e os tratamentos atualmente empregados no tratamento do CCP, cirurgia, quimioterapia e radioterapia, estão associados a morbidez dos pacientes como a dificuldade em comer, engolir e falar, diminuindo portanto a qualidade e expectativa de vida dos mesmos (SCHMIDT et al., 2016).

O tipo de terapia a ser empregada depende de parâmetros clínicos e histopatológicos do paciente (GALBIATTI et al., 2013). O estadiamento clínico do tumor é um aspecto relevante para a decisão do tratamento a ser utilizado. O sistema de estadiamento TNM tem sido adotado para classificação dos tumores primários e é baseado no tamanho do tumor (T), na presença de metástase em linfonodos (N) e de metástase a distância (M), sendo classificado de I a IV de acordo com o estágio de desenvolvimento da doença (COLOMBO, 2009). A metástases em linfonodos regionais é o principal fator considerado na tomada de decisão da terapia do doente e no prognóstico do CECP, sendo o principal fator independente associado ao prognóstico do paciente com CECP (KISHIMOTO et al., 2003).

Em pacientes que se encontram em estágio inicial do CECP (estadiamento I e II), o principal tratamento empregado é o uso individual de radioterapia ou cirurgia. Em estadiamentos mais avançados (III e IV), o tratamento combinado é recomendado, o que pode levar a cirurgia com posterior radioterapia, radioterapia e quimioterapia, ou as três modalidades associadas (SCHMIDT et al., 2016). Contudo, tumores com mesmo estadiamento clínico podem ter evolução e crescimento diferentes, demonstrando a relevância da análise de fatores que complementem as informações para se estabelecer o prognóstico da doença e dirijam o paciente para um tratamento mais adequado (THOMAS; NADIMINTI; REGALADO, 2005). Compreender a importância da heterogeneidade desses tumores, pode permitir a adaptação do tratamento usual e o refinamento de protocolos de tratamento melhorando o prognóstico do paciente (SCHMIDT et al., 2016).

1.2 Fatores de Risco

A exposição crônica a carcinógenos como o tabaco, álcool, vírus oncogênicos e inflamação podem lesar genes e grandes porções do material genético. O acúmulo destas alterações pode levar ao desenvolvimento de lesões pré-malignas e a um subsequente carcinoma invasivo (CHOI; MYERS, 2008).

Os principais fatores de risco associados ao desenvolvimento do CCP são o tabagismo, etilismo e a infecção por Papilomavírus Humano (HPV) (LIU et al., 2017). No Brasil, o CCP apresenta uma ocorrência maior entre a quinta e a sétima décadas de vida (INCA, 2016). Contudo, a frequência da doença tem aumentado em indivíduos mais jovens em decorrência do maior consumo de drogas e a elevação da incidência de HPV (ALVARENGA et al., 2008).

É bem estabelecido que o tabagismo é um fator de risco dominante para o desenvolvimento do CECP (PAI; WESTRA, 2009). A carcinogênese originada pelo tabaco é dose dependente, ou seja, o risco de desenvolver a doença é relacionado com a intensidade e duração do hábito de fumar. O cigarro contém nitrosaminas e hidrocarbonetos policíclicos carcinogênicos genotóxicos que podem aumentar o risco de doença por levar a alterações do perfil molecular dos indivíduos e causar mutações (GALBIATTI et al., 2013). Além disso, a nicotina, um composto psicoativo que causa a dependência ao cigarro, tem sido relacionada com a proteção de células tumorais contra apoptose, a promoção da angiogênese tumoral, a proliferação celular in vitro de linhagens tumorais e com uma maior agressividade do fenótipo tumoral (ZHANG et al., 2007).

O tabagismo associado ao etilismo aumenta em 30 vezes o risco de desenvolvimento de CECP (INCA, 2014). Assim como o tabaco, a relação entre o consumo de álcool é dose dependente, ou seja, quanto maior o consumo de álcool, maior o risco de desenvolver CECP (HASHIBE et al., 2007). Este papel sinérgico entre estes fatores de risco se dá pelo fato de o álcool atuar como solvente, levando a exposição da mucosa a agentes carcinogênicos e aumentando a sua absorção. Ademais, o metabolismo do etanol leva a geração de acetadeído. Este metabólito gera radicais livres que prejudicam a homeostase anti-oxidante levando a lesões teciduais (GUO; JUN, 2010), e é um potente carcinógeno, uma vez que pode levar a formação de adutos de DNA, que interferem na síntese e reparo desse ácido nucléico levando ao acúmulo de mutações (GALBIATTI et al., 2013).

A susceptibilidade e predisposição genética influenciam no desenvolvimento do CCP, o que pode estar particularmente relacionado a incidência da enfermidade em indivíduos que não estão expostos a fatores de risco, destacando a relevância do estudo de bases genéticas e moleculares associadas ao CECP (COLOMBO, 2009).

1.3 Biomarcadores

Define-se como biomarcadores (BM) “alterações celulares, bioquímicas ou moleculares que são mensuráveis em meios biológicos tais como tecidos, células ou fluidos” (HULKA BS, GRIFFITH JD, WILCOSKY TC, 1991). De acordo com Naylor (2003) amplia-se este termo para uma característica que pode ser mensurada e avaliada como indicador de um processo biológico normal, processo patogênico ou uma resposta farmacológica a uma intervenção terapêutica.

O uso de BM pode oferecer fatores de prognóstico mais rápidos, específicos e precisos, o que leva a novas estratégias terapêuticas e auxílio promissor na detecção do câncer em estádios iniciais, contribuindo para uma maior sobrevida e tratamentos com menor morbidade dos pacientes (BELBIN et al., 2005).

A viabilidade de um BM se deve se sua expressão esclarece a gravidade ou a presença de uma doença, de modo que seja significativamente maior ou menor na presença da enfermidade do que em um estado normal. Do ponto de vista das aplicações clínicas, é necessário que a quantidade de BM associados a uma doença seja o menor possível. Outra característica importante é que os BM precisam ser altamente específicos para cada tipo de enfermidade (LIU, 2014).

Os BM (por exemplo, genes, RNAs, proteínas e metabolitos) são adotados nas práticas clínicas devido à simplicidade com que são mensurados, e deste modo permitindo avaliar um processo patogênico ou condição do doente de forma menos invasiva (LIU, 2014). Alguns BM já estão bem estabelecidos e são utilizados de forma rotineira na prática clínica, como por exemplo o antígeno prostático específico (PSA) para se avaliar inflamação e o câncer da próstata (HEIDENREICH et al., 2011) e as mutações do gene BRCA para detectar o risco de desenvolvimento do câncer de mama (WARNER et al., 2011).

No CECP o uso de um BM específico ainda não foi estabelecido apesar de diversos estudos apontarem possíveis BM que possam ser utilizados como preditores de prognóstico e para diagnóstico precoce da doença. Com isso, a avaliação destes possíveis BM se faz necessária, evidenciando a relevância do estabelecimento de

parâmetros que levem a uma melhor expectativa sobre a morbidade e mortalidade associada a doença.

1.3.1 VEGF-C

Os fatores de crescimento endotelial vascular (VEGFs) pertencem a família de genes do fator de crescimento derivado de plaquetas, e desempenham papel central na regulação da angiogênese, vasculogênese e a linfagiogênese. Cinco membros da família dos VEGFs são codificados pelo genoma de mamíferos, o VEGF-A (também referido com VEGF), fator de crescimento placentário (PIGF), VEGF-B, VEGF-C e VEGF-D (URBAN et al., 2012).

A família dos VEGFs estimula respostas celulares pela ligação a receptores tirosina quinase na superfície celular levando a fosforilação de proteínas e a transdução de sinais que podem promover alterações na expressão gênica (THOMAS; NADIMINTI; REGALADO, 2005). Os receptores dos VEGFs (VEGFRs) são o VEGFR-1, 2 e 3. Os VEGFRs são codificados por três genes conservados desde anfíbios até mamíferos (URBAN et al., 2012). O VEGF-A se liga ao VEGFR-1 e ao VEGFR-2, sendo o VEGFR-2 o principal responsável por sua atividade. O VEGF-C também se liga ao VEGFR-2 mediando processos angiogênicos, no entanto possui menor afinidade por este receptor. O VEGFR-3 medeia as principais respostas associadas ao VEGF-C e VEGF-D ligadas a linfagiogênese. O PIGF atua mediante ligação aos receptores VEGFR-1 e 2 durante o desenvolvimento da placenta (STUTTFELD; BALLMER-HOFER, 2009).

O VEGF-C é uma proteína dimérica secretada, codificada por um gene homônimo localizado no cromossomo 4q34. Para desempenhar sua atividade biológica, esta proteína passa por processos de maturação proteolítica após sua tradução. A forma inativa do VEGF-C possui 3 domínios, o domínio de homologia, domínio N-terminal e domínio C-terminal. A primeira clivagem do VEGF-C ocorre logo após sua secreção por meio de enzimas convertases, resultando em uma forma intermediária, o pró-

VEGF-C, consistindo de duas cadeias polipeptídicas, que apesar de ser inativa, pode se ligar ao VEGFR-3. Uma segunda clivagem ocorre do pró-VEGF-C entre o domínio n-terminal e o domínio de homologia por metaloproteinases ou plasmina, o que leva então a forma ativa desta proteína (JOUKOV et al., 1997).

A afinidade do VEGF-C pelos receptores VEGFR-2 e 3 aumenta com a maturação desta proteína, e somente a forma totalmente processada do VEGF-C possui afinidade pelo receptor VEGFR-2. Com a ligação do VEGF-C, ambos receptores tornam-se rapidamente fosforilados, induzindo vias de sinalização celular (OLOFSSON et al., 1999). Como mencionado, o VEGF-C possui papel na angiogênese e linfangiogênese. Esta proteína também atua no crescimento e proliferação do endotélio celular e na permeabilidade de vasos sanguíneos. A sinalização do VEGF-C através do VEGFR-3 é indispensável para o desenvolvimento de vasos linfáticos, enquanto quando associado ao VEGFR-2 atua na angiogênese (LEPPÄNEN et al., 2010).

Angiogênese e linfangiogênese, o crescimento de novos sanguíneos e vasos linfáticos a partir de vasos pré-existent, respectivamente, são importantes eventos biológicos durante o desenvolvimento embrionário, crescimento, cicatrização de feridas e na patogênese de várias doenças (LEPPÄNEN et al., 2010). As bases moleculares da angiogênese tem sido extensivamente estudadas, uma vez que é crucial não somente em vias fisiológicas, mas também está envolvida em processos patológicos, como o câncer (URBAN et al., 2012). Em diversas neoplasias a angiogênese é crucial para o crescimento de um tumor primário e para o desenvolvimento de metástases à distância. Entre os fatores que causam a angiogênese do tumor, os VEGFs são os principais candidatos (KYZAS et al., 2005).

Os vasos linfáticos consistem de uma via de condutores endoteliais de fluidos de tecidos periféricos para a circulação sanguínea. O excesso de fluidos extravasados da circulação sanguínea é drenado pelos vasos linfáticos e retorna para o sangue. Além de fluidos e solutos, os vasos linfáticos também transportam células, em condições fisiológicas as células imunes, e em situações patológicas levam agentes infecciosos e células cancerígenas para tecidos linfoides (ALITALO; DETMAR, 2012).

Na fase embrionária a linfagiogênese é fundamental para a migração e germinação iniciais das células endoteliais, sendo o VEGF-C o principal responsável por esse processo (KARKKAINEN et al., 2004). No entanto, a sobreexpressão dessa proteína tem sido relacionada com metástases linfonodais, aumento da densidade linfática e sobrevida reduzida em diversos cânceres (KYZAS; STEFANO; AGNANTIS, 2005; THOMAS; NADIMINTI; REGALADO, 2005).

A linfagiogênese associada ao tumor facilita que as células cancerígenas migrem do sítio primário da neoplasia para outros tecidos e órgãos através de um linfonodo sentinela, que é o primeiro linfonodo a receber a drenagem linfática proveniente do tumor, iniciando o processo metastático da doença (figura 1) (JÚNIOR; ANTÔNIO; NETO, 2000).

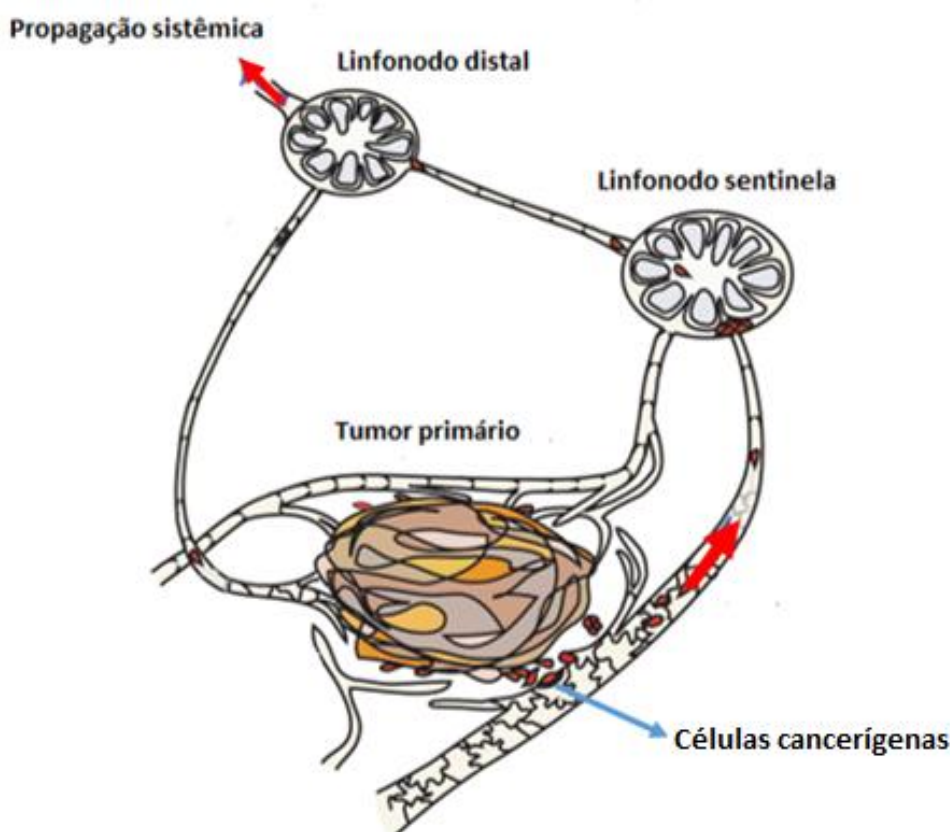


Figura 1. Caminho das células tumorais metastáticas no sistema linfático. As células metastáticas tumorais entram no fluido drenado dos vasos linfáticos e são passivamente drenadas para o linfonodo sentinela de onde pode ocorrer disseminação adicional para os linfonodos distais, para a circulação sanguínea e órgãos distantes. Fonte: Alitalo & Detmar (2012).

A ativação do receptor VEGFR-3 pelo acoplamento de VEGF-C nas células endoteliais linfáticas pode facilitar a metástase aumentando a formação de vasos

linfáticos em torno dos tumores, desempenhando um papel crucial na proliferação, sobrevivência, e resistência de células tumorais. Além disso, a ativação do VEGF-C / VEGFR-3 aumenta a mobilidade das células cancerígenas e a sua capacidade de invadir outros sítios, promovendo a metástase (SU et al., 2007).

De acordo com Gout & Hout (2008), é possível que exista uma relação entre células tumorais e células endoteliais linfáticas para induzir a linfangiogênese e a formação de metástases linfonodais. Um mecanismo proposto é que o VEGF-C quando acoplado ao seu receptor VEGFR-3 ativa células endoteliais linfáticas através de fatores mitogênicos, fazendo com que estas células secretem fatores quimiotáticos. Os fatores quimiotáticos por sua vez irão atrair as células cancerígenas, que possuem receptores dessas quimioquinas, permitindo sua adesão e invasão através dos vasos linfáticos, dando origem ao processo metastático (figura 2) (KARKKAINEN; MÄKINEN; ALITALO, 2002).

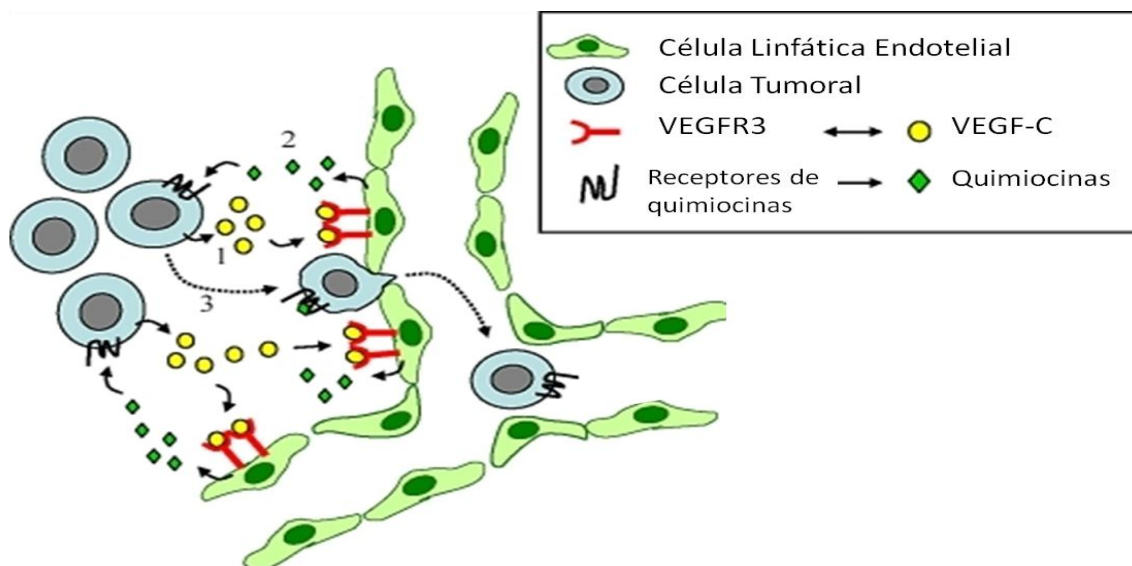


Figura 2. Invasão de células tumorais através de vasos linfáticos induzido por VEGF-C. Fonte: Gout & Hout (2008).

Em um modelo de câncer de pele em camundongos transgênicos que sobreexpressavam VEGF-C, foi observado por Hirakawa et al., (2007) que esta proteína induzia a linfangiogênese em linfonodos sentinela na presença de células

tumorais, e que os animais com metástases nesses linfonodos tinham uma maior propensão a desenvolverem metástases em outros órgãos, indicando a importância da formação de novas vias linfáticas pelo VEGF-C na promoção propagação do câncer.

Um estudo de metanálise mostrou que a sobreexpressão de VEGF-C em câncer de mama é um fator de prognóstico para a taxa de sobrevida livre de doença e sobrevida global dos pacientes e um potente alvo para otimizar o tratamento (ZHANG et al., 2016).

No câncer de ovário, o aumento da expressão de VEGF-C tem sido associado com o aumento da invasão do espaço linfático por células tumorais da densidade linfática, com o surgimento de metástases linfonodais e com o pior prognóstico dos pacientes (HISAMATSU et al., 2015). Neste mesmo artigo, foi mostrado em modelo de camundongos com câncer de ovário que a atenuação de expressão de VEGF-C inibe significativamente a linfagiogênese e diminui a metástase linfonodal.

Em pacientes em estadiamento inicial do câncer de esôfago, a expressão aumentada de VEGF-C tem se mostrado com um fator preditivo para metástase linfonodal e com o pior prognóstico da doença. Relacionando a expressão de VEGF-C a taxa de sobrevida dos pacientes, foi observado que aqueles pacientes com maior expressão da proteína viveram menos que os pacientes com baixa expressão de VEGF-C. Além disso, a presença de metástase linfonodal também mostrou estar relacionada a sobreexpressão de VEGF-C (TANAKA et al., 2010).

Nas neoplasias de cabeça e pescoço, o nível de VEGF-C em estágio inicial da doença tem se mostrado como fator preditivo independente para metástase em linfonodos cervicais (THOMAS; NADIMINTI; REGALADO, 2005). No CECP, lesões metastáticas no sistema linfático e a presença de metástase em órgãos distantes são os grandes preditores da sobrevida específica livre de doença no momento do diagnóstico (BENKE et al., 2010).

Kishimoto et al., (2003) observaram que a expressão de VEGF-C em biopsias de pacientes com carcinoma oral de células escamosas é maior no estágios iniciais da doença (I/II) e é fortemente correlacionada com a metástase em linfonodos regionais, e que é a porcentagem da expressão desta proteína é presente em quase 90% dos

indivíduos que apresentam envolvimento linfonodal , indicando que o VEGF-C é um potente preditor da metástase em linfonodos podendo ser utilizado para direcionar o tratamento do doente.

O aumento de VEGF-C em pacientes com CECp foi correlacionado por Kyzas et al., (2005) com a sobreexpressão de COX-2. Após análise de blocos de tumor por imunohistoquímica, foi observado que a sobreexpressão de ambas proteínas era significativamente superior naqueles pacientes com metástases em linfonodos, e a associação era ainda maior quando a sobreexpressão de COX-2 e VEGF-C era concomitante. Além disso, observou-se neste estudo que os níveis elevados de VEGF-C foi correlacionado com o aumento da mortalidade dos pacientes.

Em modelos de cultivo celular de CECp, a expressão de VEGF-C influenciou diretamente na mobilidade e crescimento das células tumorais. A destruição mediada da expressão de VEGF-C em células que expressam níveis elevados quimiocinas, resultou numa diminuição da proliferação desse cultivo. Inversamente, a expressão aumentada de VEGF-C em células com baixos níveis endógenos de quimiocinas aumentou o crescimento celular, e a supressão de VEGF-C levou a inibição da migração dessas células. Além disso, o crescimento tumoral in vivo foi marcadamente reduzido quando a expressão de VEGF-C foi bloqueada. A determinação da expressão de VEGF-C em linhas de células de CECp mostrou sobreexpressão universal em comparação com células normais. Estes dados reforçam o importante papel desta proteína na progressão e metástase do CECp (BENKE et al., 2010).

Em relação aos fatores externos que influenciam na expressão de VEGF-C, há poucos trabalhos abordando o assunto. A nicotina, composto presente no cigarro, parece estar relacionada ao aumento da expressão de VEGF-C em linhagens de células de câncer cervical e carcinoma celular urotelial. Em um estudo publicado por Lane et al., (2005), a exposição de nicotina nestes cultivos celulares aumentou significativamente os níveis de VEGF-C. Além disso, em outro estudo foi mostrado que em fumantes polimorfismos do VEGF-C levam a um pior prognóstico de pacientes com carcinoma celular urotelial em relação a não fumantes (TUNG et al., 2014).

No entanto, não foram encontrados trabalhos associando o VEGF-C ao tabagismo ou a outros fatores externos relacionados ao CECP como o alcoolismo, evidenciando a necessidade de avaliar os parâmetros que podem influenciar na expressão dessa proteína, bem como seu papel na progressão e metástase tumoral e no prognóstico desta doença.

1.3.2 COX-2

Nos mamíferos são encontradas duas isoenzimas cicloxigenase (COX), a cicloxigenase 1 (COX-1) e a cicloxigenase 2 (COX-2), sendo o tipo de estímulo recebido pela célula o principal determinante da ação de uma dessas enzimas (figura 3) (GREENHOUGH et al., 2009).

Estímulos fisiológicos e/ou patológicos às células levam a clivagem do ácido aracdônico presente na membrana extracelular fosfolipídica pela ação de fosfolipases (MATSUOKA; NARUMIYA, 2007). O ácido aracdônico liberado é convertido pela ação de enzimas do retículo endoplasmático liso em prostaglandinas, iniciando a formação de prostaglandina H_2 , o precursor imediato de outras prostaglandinas e tromboxanos. As reações que levam a formação de prostaglandina H_2 se dá pela introdução de um oxigênio no ácido aracdônico e uma posterior peroxidação, ambos processos são catalisados pela enzima bifuncional COX, também denominada prostaglandina H_2 -sintase (NELSON; COX, 2014).

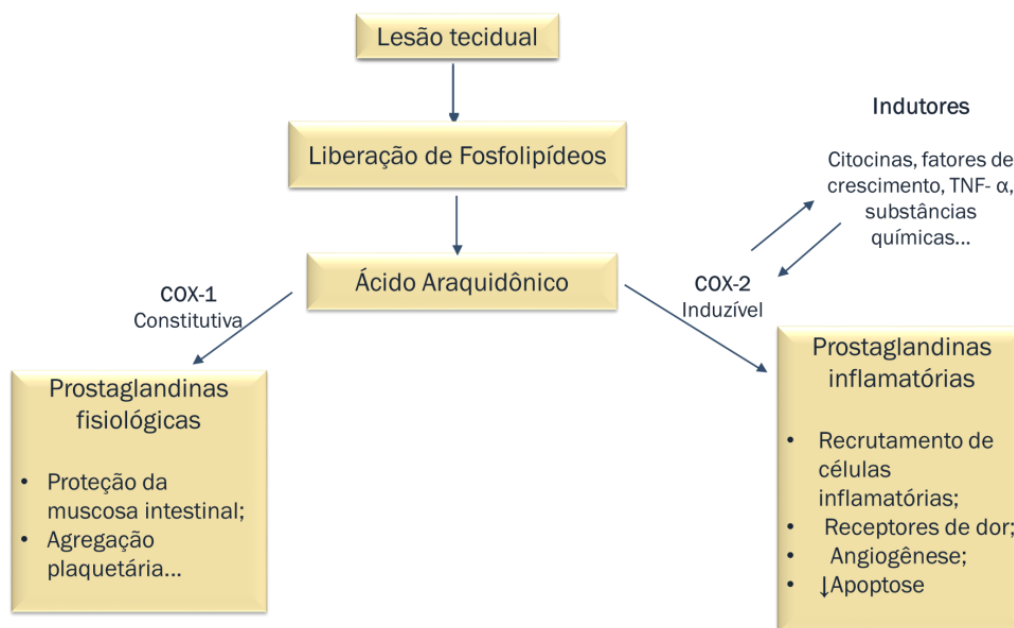


Figura 3. Ação da COX-1 e COX-2 frente a estímulos recebidos pelas células. O tipo de estímulo recebido irá determinar a ação de cada uma dessas enzimas e o tipo de resposta mediada no organismo. Disponível em: www.medscape.com, acesso em 25/09/2016.

A COX-1 é constitutivamente expressa na grande maioria dos tecidos e órgãos, levando a formação de prostaglandinas com funções fisiológicas, como a proteção da mucosa intestinal, controle do fluxo sanguíneo renal e homeostase (GREENHOUGH et al., 2009). Já a COX-2 catalisa a conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas inflamatórias, que são mediadores chave da inflamação. Algumas dessas prostaglandinas (PG), como a prostaglandina E₂, PGF_{2α}, e 15d-PGJ₂, têm sido associadas com a carcinogênese (KUNDU; SURH, 2008).

A COX-2 é um produto gênico de resposta rápida e imediata, em geral ausente na maioria das células e tecidos, mas com expressão altamente induzida por estímulos, conduzindo à produção de prostaglandinas em processos patofisiológicos, como a formação de edema, dor, febre e tumorigênese (FRACON et al., 2008; YU et al., 2008; ZHANG et al., 2003). A expressão de COX-2 pode ser induzida por citocinas, hormônios, espécies reativas de oxigênio, agentes mutagênicos como o benzopireno e carcinógenos do tabaco, agentes mitogênicos e fatores de crescimento (LIN et al., 2002).

Os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) são o alvo terapêutico para inibir a ação da COX-2, no entanto, podem provocar efeitos adversos no organismo uma vez que também inibem a COX-1 (KIRKBY et al., 2014). Na década de 90 com o

A sobreexpressão de COX-2 está relacionada a metástase de tumores malignos, levando a diminuição da adesão celular causada por alterações dos fatores de adesão de superfície celular e matriz extracelular, além de promover a neovascularização dos tumores (KIM et al., 2009).

No carcinoma epidermóide de esôfago, a expressão de COX-2 no estágio inicial da doença está envolvida na displasia, no carcinoma in situ e na invasividade do tumor, e tem uma maior expressão nas células cancerígenas quando comparadas à células epiteliais saudáveis (ZHI et al., 2006). Em modelo animal, a supressão da expressão de COX-2 por intervenção farmacológica no carcinoma epidermóide de esôfago resulta na diminuição da produção de prostaglandina E2 e reduz a tumorigênese nesses animais (ZHI et al., 2006).

Em pacientes com câncer de cólon, a expressão de COX-2 é um fator independente de prognóstico da doença. De acordo com Ogino et al., (2008) pacientes com tumores positivos para COX-2 tiveram uma tendência a irem óbito ocasionado pela doença e uma sobrevida global reduzida em relação a pacientes que não expressaram a proteína.

A expressão de COX-2 tem sido observada durante o desenvolvimento do câncer de mama e é intensificada com o estágio de detecção, progressão e metástase da doença. Características essenciais da carcinogênese mamária (mutagênese, mitogênese, angiogênese, apoptose reduzida, metástase e imunossupressão) estão ligadas à biossíntese de prostaglandina-E2 induzida pela COX-2. Além disso, agentes que inibem a COX-2 reduzem o risco de câncer da mama em mulheres sem a doença e reduzem o risco de recorrência e a mortalidade em mulheres que tem diagnóstico confirmado (HARRIS, 2014).

Diversos trabalhos têm demonstrado que a COX-2 é superexpressa no CECP e relacionado com o pior prognóstico da doença. A expressão citoplasmática de COX-2 tem sido observada em 70-88% das amostras de CECP, usando a técnica de imunohistoquímica a partir de amostras teciduais (GALLO et al., 2002) e em 87% das amostras de espécimes realizando qPCR (PENG et al., 2002). Além disso, estes estudos mostraram que a expressão de COX-2 é significativamente maior em amostras de pacientes com metástase em linfonodos cervicais e em tumores com

estadiamento avançado.

Gallo et al., (2002) relataram que a superexpressão da COX-2 em CECP estava relacionada à tumores mais agressivos e em estágio avançado. Complementando esses resultados, os autores mostraram por análise de sobrevivência que pacientes com baixo percentual de células tumorais positivas para COX-2 apresentaram melhor prognóstico do que os com superexpressão da mesma.

A quimiorradioterapia é uma das modalidades de tratamento mais empregadas no CCP, no entanto, Mohammad et al., (2011) sugeriram que pacientes com carcinoma epidermóide oral com sobreexpressão de COX-2 eram mais resistentes a esta terapia em comparação aos pacientes que apresentavam baixa expressão da enzima. Ademais, a sobreexpressão de COX-2 nestes pacientes estava associada a tumores de maior tamanho e metástase de linfonodos cervicais.

Salimi et al., (2012) documentaram que a exposição in vitro à nicotina resulta no aumento da expressão de COX-2, bem como um aumento significativo nos níveis de VEGF em comparação com um grupo de controle. Os resultados sugerem que a estimulação da COX-2 e de expressão de VEGF pode contribuir como fatores importantes na ação tumorigênica da nicotina na progressão do CECP.

Deste modo, compreender o papel que a COX-2 exerce no CECP é de suma importância, uma vez que pode permitir elucidar a forma com que esta doença progride, e ser um indicador de prognóstico e um potente alvo de tratamento da doença.

1.3.3 IL-17A

A família de citocinas pro-inflamatórias da interleucina-17 (IL-17) é uma subclasse de citocinas recentemente descrita (AGGARWAL; GURNEY, 2002). A descoberta dos membros da família da IL-17 e seus correspondentes receptores, levou a novas

percepções sobre a imunidade em processos infecciosos e autoimunidade (ONISHI; GAFFEN, 2010).

Seis membros da família da IL-17 foram descritos até o momento, (IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E ou IL-25, e a IL-17F) e cinco receptores (IL-17RA, IL-17RB / IL-25R, IL-17RC, IL-17RD / SEF e IL-17RE), que atuam por meio quinases levando ao desencadeamento de vias de sinalização celular e transcrição de genes (GAFFEN, 2009). A interação dos receptores de IL-17 com a respectiva citocina está apresentado na figura 5, e como pode ser observado, o receptor da IL-17D permanece desconhecido, bem como o ligante do receptor IL-17RD (GAFFEN, 2009).

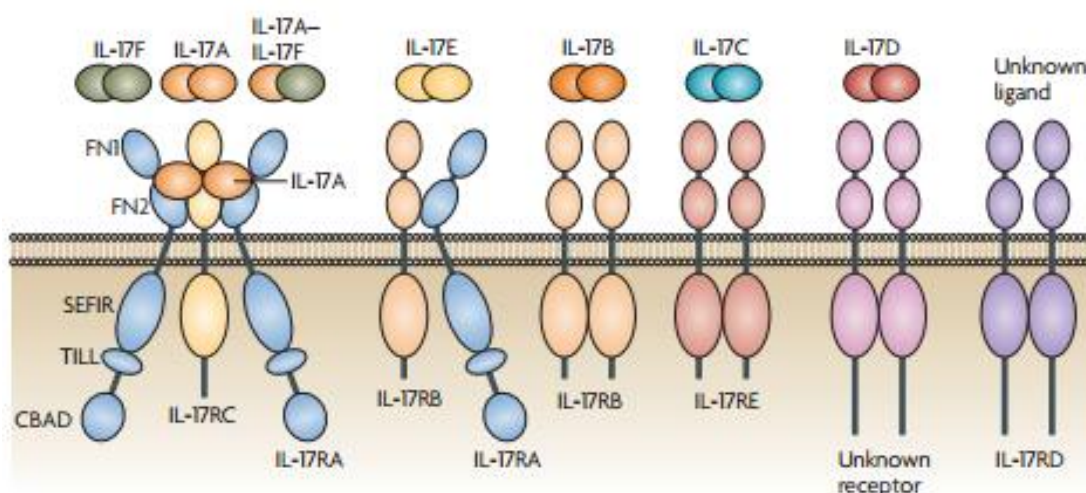


Figura 5. Receptores da família de citocinas IL-17 e sua interação com os respectivos receptores. Fonte: Gaffen,(2009).

A produção de IL-17 era inicialmente atrelada somente às células T, no entanto, atualmente sabe-se que estas citocinas pode ser originadas por uma variedade de células inatas incluindo macrófagos, células dendríticas, células natural killers e por tecido linfoides (ONISHI; GAFFEN, 2010). Uma maior compreensão desse fator ocorreu com a identificação em 2005 de um novo tipo de célula T auxiliar, a célula T auxiliar 17 (Th17), mudando o paradigma de diferenciação das células T auxiliares em células Th1 e Th2 (HARRINGTON et al., 2005).

É bem estabelecido que a IL-12 induz células Th1 e IL-4 induz células Th2. Porém, foi apenas recentemente demonstrado que as células Th17 diferenciam-se por

exposição a combinações de IL-1, IL-6 e fator de crescimento de transformação- β (HARRINGTON et al., 2005). A interleucina-23, é necessária para estabilização e proliferação de células Th17 (STOCKINGER; VELDHOFEN, 2007).

As células Th17 são pró-inflamatórias e tem função importante na imunidade da mucosa e nas doenças e auto-imunes, como a esclerose múltipla, doenças inflamatórias do intestino e psoríase humana (KESSELRING et al., 2010). A função das células Th17 na imunidade adaptativa é bem estabelecida, uma vez que exerce papel fundamental na resposta contra microrganismos extracelulares (fungos e bactérias) através do recrutamento de neutrófilos, que fagocitam e destroem estes microrganismos. (YE; LIVERGOOD; PENG, 2013). A IL-17A é a citocina de assinatura das células Th17 (ONISHI; GAFFEN, 2010).

Dos membros da família da IL-17, a IL-17A é a que tem sido mais estudada (KOLLS; LINDÉN, 2004). Apesar de ser a principal citocina associada a célula Th17, existem subpopulações de células T capazes de produzir IL-17A. A secreção de IL-17A por essas células conduz à indução de quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias, prostaglandina-E2, metaloproteinases da matriz e peptídeos antimicrobianos em células do tecido circundante, levando a inflamação e o recrutamento de neutrófilos e macrófagos na imunidade inata (KESSELRING et al., 2010).

Tanto a IL-17A quanto a IL-17F são responsáveis pelo recrutamento, ativação e migração de neutrófilos. A IL-17A também regula a formação de centros germinativos e a produção de autoanticorpos característicos nas doenças autoimunes como artrite reumatoide, lúpus sistêmico eritematoso e psoríase (ONISHI; GAFFEN, 2010).

A IL-17A tem sido relacionada a diversos tipos de cânceres (YOUNG, 2016). No entanto, o papel da IL-17A no câncer é controverso, uma vez que tanto efeitos pró e anti-tumorais tem sido associados a esta citocina (figura 6) (WEI et al., 2016). A presença de IL-17A está relacionada a resistência do tumor a tratamentos de inibição de VEGF, o que dificulta o tratamento de alguns tipos de câncer (CHUNG et al., 2013). Em modelo animal, a indução de IL-17A levou tanto a progressão tumoral pelo aumento da angiogênese, quanto a supressão tumoral através do recrutamento de células imunes (GU et al., 2011).

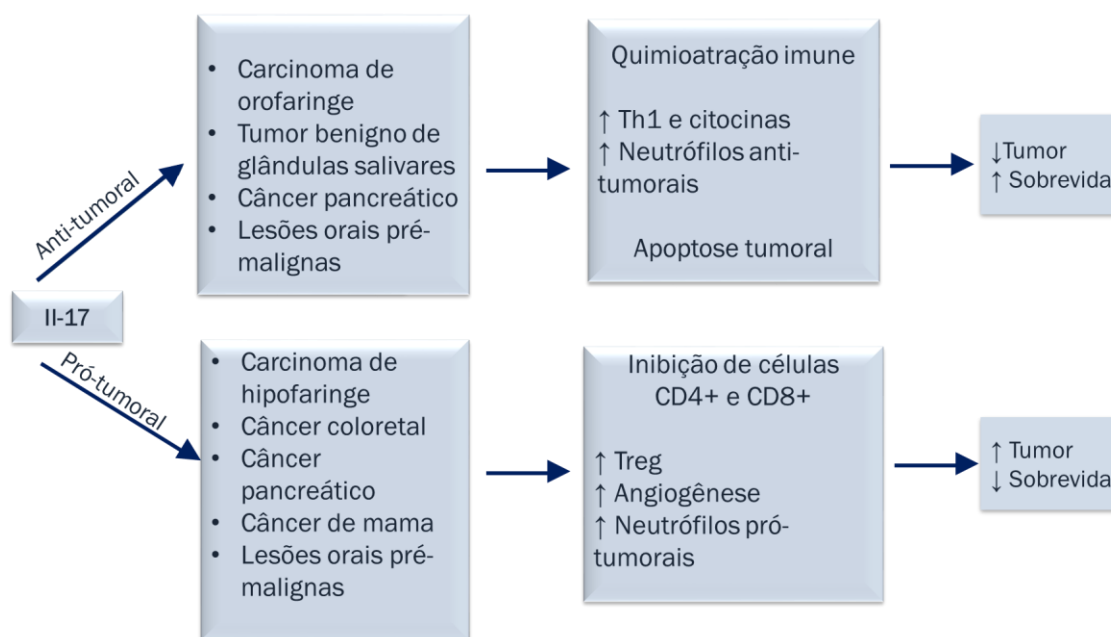


Figura 6. Visão geral da atividade pró e anti-tumorigênica da IL-17A. Fonte: Young (2016).

No carcinoma hepatocelular, a IL-17A parece potencializar a metástase das células tumorais e levar ao crescimento tumoral. O tratamento com IL-17A in vitro demonstra efeito direto no crescimento de células tumorais e aumenta a secreção de fatores promotores de invasão celular. In vivo a IL-17A leva ao crescimento do tumor, neoangiogênese e recrutamento de neutrófilos para o ambiente tumoral. A análise de blocos de tumor de pacientes com carcinoma hepatocelular, mostrou que a expressão de IL-17A é associada com a ativação de fatores de transcrição, infiltração de neutrófilos e aumento de vascularização do tumor (GU et al., 2011).

No entanto, a elevada expressão de IL-17A está associada a uma maior progressão de sobrevida livre doença em pacientes com câncer de ovário em estágio avançado. Em estudo publicado por Lan et al., (2013) foi observado que a expressão de IL-17A em tumores de ovário avançados era maior que em células de ovário saudável. Os dados encontrados pelos autores sugeriram que a maior expressão de IL-17A estava associada com a menor diferenciação do tumor e foi um fator positivo independente para a melhor progressão de sobrevida livre de doença dos pacientes.

No CECP o papel da IL-17A é controverso e pouco se sabe sobre sua função nessa doença. O papel controverso da IL-17A no microambiente tumoral também se faz presente em pacientes com carcinoma de células escamosas de cavidade oral. Segundo Li et al., (2011) a IL-17A pode estar envolvida na progressão do

crescimento tumoral e no desenvolvimento de metástases, enquanto Gaur et al., (2012) encontrou alta frequência de IL-17A em pacientes com estágio inicial da doença e sem envolvimento de linfonodos.

Em uma abordagem recente, Wei et al., (2016) encontram que níveis de IL-17A em soro e em amostras de tumor foram significativamente aumentados em pacientes com carcinoma epidermóide de língua, e estava positivamente correlacionado com a metástase tumoral. Os pesquisadores ainda observaram que o nível de IL-17A estava relacionado com a migração e invasão das células tumorais.

Deste modo, faz-se necessário compreender qual o papel da IL-17A na carcinogênese do CECP e avaliar se esta citocina é um potencial BM alvo de diagnóstico, prognóstico e tratamento da doença.

Mediante o papel do VEGF-C, COX-2 e IL-17A no desenvolvimento do câncer, propõe-se este estudo para elucidar o comportamento biológico do CECP e as vias pelas quais estes BM atuam nesta doença, bem como estabelecer quais fatores influenciam neste processo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar a expressão de VEGF-C e COX-2 e os níveis de IL-17A e seu papel como biomarcadores no Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a expressão gênica de VEGF-C e COX-2 em tecido tumoral e normal;
- Avaliar a expressão proteica de VEGF-C e COX-2 em soro de pacientes com CECP e controles;
- Quantificar os níveis de IL-17A em soro de pacientes com CECP e controles;
- Avaliar o papel da IL-17A no CECP;
- Relacionar as análises dos biomarcadores aos dados clínico-patológicos dos pacientes: sexo, estadiamento, metástase em linfonodos regionais, tabagismo e etilismo;
- Avaliar se VEGF-C, COX-2 e IL-17A são potenciais biomarcadores do CECP.

3 METODOLOGIA

3.1 Aprovação pelo comitê de ética e perfil clínico-epidemiológico

Foi realizado um estudo clínico transversal nos pacientes com câncer de cabeça e pescoço atendidos no ambulatório do Hospital Santa Rita de Cássia – AFECC e Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes - HUCAM sob aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa CIAS nº 318/2011 (Anexo 1) e o consentimento informado obtido de acordo com o Conselho Nacional de Saúde nº196, de 10 de outubro de 1996.

3.1.1 Perfil clínico-epidemiológico

Foram incluídos neste estudo indivíduos com diagnóstico confirmado de CECP de ambos os gêneros, grupos étnicos ou faixa etária, sem antecedentes de CECP, antes de iniciarem o tratamento antineoplásico. Informações como hábito de fumar e beber, idade e sexo foram coletados pela aplicação de questionário.

O grupo controle deste estudo foram indivíduos saudáveis (sem diagnóstico de CECP ou outro câncer) recrutados no ambulatório de cabeça e pescoço do Hospital Santa Rita de Cássia – AFECC de ambos os gêneros, grupos étnicos, faixa etária sendo pareados por idade e sexo aos pacientes com câncer.

As amostras de tecido normal e tumor utilizadas são provenientes do procedimento cirúrgico de ressecção do tumor de pacientes com CECP. As amostras de tecido normal são de pacientes de ambos os sexos, não tabagistas, não etilistas e sem envolvimento linfonodal.

Todos os participantes incluídos neste estudo assinaram termo de consentimento livre e esclarecido de participação da pesquisa.

3.1.2 Obtenção de amostras biológicas

As amostras de tumor para este estudo foram obtidas de pacientes com CECP submetidos a cirurgia no Hospital Santa Rita de Cássia - AFECC e Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes- HUCAM. Após a excisão, os tecidos foram imediatamente imersos em soluções de Invitrogen™ RNeasy™ (Carlsbad, Califórnia, EUA) e armazenados a 4 ° C durante 24 horas e em seguida à temperatura de -80 ° C até utilização, segundo protocolo descrito.

As amostras de sangue foram coletadas no momento da inclusão do paciente no estudo. O sangue foi processado separando-se plasma, soro, sangue total, hemácias, plaquetas e leucócitos, e posteriormente acondicionas por 24 horas à 4 ° C e em seguida à -80 ° C até o momento das análises.

3.2 Análise da expressão gênica por qPCR

Foi verificada a expressão do mRNA de COX-2 e VEGF-C em tecido normal e tumoral através de qPCR conforme descrito abaixo.

3.2.1 Extração de RNA total

Os tecidos foram homogeneizados e o RNA total extraído utilizando TRI Reagent RNA Isolation Reagent (Sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA). Os tecidos foram solubilizados em trizol (1mL/100mg de tecido) com o uso de um homogeneizador elétrico por 30 segundos e o homogenato centrifugado a 12.000 xg por 15 minutos a 4°C. Foi adicionado clorofórmio (200µL/100mg tecido) ao sobrenadante, misturado por inversão por 15 segundos e incubado a temperatura ambiente por 5 minutos. A mistura foi então centrifugada a 12.000xg por 20 minutos a 4°C. A fase aquosa foi recuperada e a esta adicionada isopropanol (500µL/100mg tecido) para a precipitação do RNA. Foi feita a centrifugação a 12.000xg por 15 minutos e o precipitado lavado com etanol 75% (1mL/100mg tecido) e centrifugado a 7500xg por 5 minutos. O RNA foi ressuspendido em 40 µL de água deionizada, previamente tratada com dietilpirocarbonato (DEPC).

A concentração e a qualidade do RNA extraído foram verificadas utilizando o equipamento NanoDrop™ (ThermoScientific, Wilmington, USA). Amostras com uma concentração de RNA total maior que 200 ng/µl e uma razão de absorbância 260/280 nm maior que 1,8 foram consideradas adequadas para uso.

3.2.2 Desenho de primers

Os primers utilizados foram desenhados com a ferramenta online Primer-BLAST (NCBI) e adquiridos da Invitrogen (Carlsbad, Califórnia, EUA) (tabela 1).

Tabela 1- Sequência de primers forward e reverse de VEGF-C, COX-2 e β -Actina.

Gene	Forward	Reverse
VEGF-C	5'-GCCCCAAACCAGTAACAATC-3'	5'-TCTTGTTTCGCTGCCTGAC-3'
COX-2	5'-GTTCCACCCGCAGTACAGAA-3'	5'-AGGGCTTCAGCATAAAGCGT-3'
β -Actina	5'-AGTTCACAATGTGGCCGAGG-3'	5'-AGTGGGGTGGCTTTTAGGATG-3'

3.2.3 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada com o kit iScript cDNA Synthesis Kit (Biorad, CA, USA) usando o equipamento CFX96 Real Time PCR (Biorad, CA, USA) do Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares CCS/UFES.

Foi utilizado uma concentração de 2000 ng/ μ l de RNA total, com volume final dependente da amostra. As condições da reação foram as seguintes: 25°C por 5 min., 42°C por 30min. e 85°C por 5 min, de acordo com o especificado pelo fabricante.

3.2.4 PCR quantitativo em tempo real

As amostras de cDNA obtidas foram submetidas à reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real (qPCR) utilizando o equipamento CFX96 Real Time PCR (Biorad, CA, USA) e o kit iQ SYBR Green Supermix (Biorad, CA, USA), no Laboratório Multiusuário da Universidade Federal do Espírito Santo. Em suma, as

reações foram preparadas em um volume total de 10 μ L contendo 5 μ L de SYBR Green Supermix 2x, 3,5 μ L de água purificada, 0,5 μ L de cada iniciador a 10 μ M e 0,5 μ L de cDNA. Foram realizados 45 ciclos após a desnaturação inicial (95°C, 2 minutos) de acordo com os seguintes parâmetros: 95°C (desnaturação) por 15s; 60°C (anelamento) por 30s e 72°C (amplificação) por 30s.

Para garantir a qualidade da reação, as amostras foram preparadas em triplicata, e para cada experimento foi incluído uma reação sem molde como controle negativo. Além disso, a ausência de contaminantes de DNA foi avaliada utilizando-se amostras RT-negativas e pela análise da curva de “melting” dos produtos amplificados, que foi feita resfriando-se as amostras a 60°C e, em seguida, aumentando a temperatura para 95°C a 0,1°C/s. A especificidade das reações de PCR foi confirmada pela verificação dos da curva de melting. A quantificação relativa da expressão gênica foi analisada pelo método de $\Delta\Delta C_t$ com o gene normalizador β -actina. Para cada amostra, o valor do ΔC_t foi obtido subtraindo o valor de C_t β -actina pelo valor do C_t de VEGF-C ou COX-2. A análise dos resultados foi realizada com o uso do software Bio-Rad CFX Manager (Biorad, CA, USA).

3.3 Western Blotting

Foram determinados os níveis das proteínas VEGF-C e COX-2 em soro pelo método de Western Blotting utilizando anticorpos específicos.

3.3.1 *Quantificação das proteínas*

A quantificação das proteínas presentes em soro foi determinada utilizando-se o

método de Bradford em placas de ELISA de 96 poços, com uma leitura em espectrofotômetro a 560nm, sem diluição das amostras. Primeiramente fez-se uma curva padrão de BSA (albumina sérica bovina) partindo de uma concentração conhecida (1mg/mL), pipetada em diferentes volumes de água miliQ (pontos de 1 a 5) a fim de obter diferentes concentrações para obter a curva. Foram utilizados 2, 4, 8, 16, 32 e 40 µL de BSA, completando sempre com água miliQ até um volume de 40 µl, gerando concentrações de 5, 10, 20, 40, 80 e 100%. Para o branco não é usado BSA e para as amostras foi usado um volume fixo de 2 µl de soro. As dosagens foram realizadas em triplicata.

Finalmente, todas as soluções foram incubadas com solução de Bradford e a absorbância foi medida a 560nm no leitor de placas ELISA, ELx800 Absorbance Reader (Winooski, Vermont, EUA).

3.3.2 Limpeza da albumina das amostras de soro

Foi desenvolvida uma metodologia nova e econômica para a remoção do excesso de albumina das amostras de soro que foram utilizadas neste estudo. Esta metodologia foi baseada na modificação do trabalho de Liu et al., (2014) e não será descrita nesta dissertação, uma vez que se encontra sob processo de patenteamento.

3.3.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

Com as proteínas totais de Soro foi feita uma eletroforese de proteínas em gel de

poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE).

Os reagentes utilizados para a preparação dos géis foram:

- Água MiliQ
- Bis/Acrilamida: 30%
- TEMED: 100%
- Persulfato de amónio (APS): 10% em água MiliQ.
- Tampão de separação: Tris 1,5M – SDS (0,1%) pH 8,6
- Tampão de empilhamento: Tris 0,5M – SDS (0,1%) pH 6,8

Os géis foram feitos no sistema de montagem Tetra Mini Protean-célula (Biorad, CA, USA) com 0,75mm de espessura. A porcentagem de bis/acrilamida no gel de separação foi de 12,5% e no gel de empilhamento foi 4%.

Foi agregada a água destilada, o buffer correspondente e a solução bis/acrilamida, em seguida, o TEMED junto com o APS. A mistura foi agitada rapidamente e colocada entre o espaço das duas vidraças. Para a polimerização foi colocado uma alíquota de etanol para prevenir a deformação do gel de separação. Após 30 minutos, o etanol foi removido e o gel de empilhamento foi adicionado, colocando o pente plástico para formar os poços.

Após a polimerização do gel, os vidros foram encaixados no suporte para cuba de eletroforese, que foi completada com o tampão de Corrida (Tris Base 25mM, Glicina 192mM, SDS 0,1%, água), e posteriormente o pente foi removido.

As amostras correspondentes foram preparadas segundo o volume calculado para 25µg de proteínas em soro, com um volume de água miliQ até 14 µL e com 7µL de Tampão de Laemmli (2x: Tris 0,5M, SDS 0,1% pH 6,8 / SDS 10% / Glicerol / DTT / Azul de Bromofenol) e finalmente colocadas no aparelho de aquecimento a 95°C entre 5 e 10 minutos. Logo após, foram carregados os poços com todo o conteúdo das amostras, com um poço preenchido com o marcador de peso molecular.

A eletroforese foi realizada com voltagem constante de 100V até que a frente da eletroforese penetrasse totalmente no gel inferior e em seguida a 150V até o fim da eletroforese a 4 °C.

3.3.4 Transferência de proteínas para a membrana

Uma vez completada a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF), Biorad (Biorad, CA, USA). Desta forma, as proteínas foram imobilizadas para a reação com os anticorpos. Antes disso, foi feita a ativação das membranas utilizando metanol durante 5 minutos, seguido do uso do tampão de transferência a 4 graus por 10 minutos na mesa agitadora. A transferência das proteínas do gel para a membrana foi realizada pela eletrotransferência molhada a 60V.

3.3.5 Immunoblotting

A membrana foi cortada de acordo com o trecho de interesse baseado no peso molecular do padrão, permitindo incubar cada segmento da membrana com o anticorpo primário de interesse e impedindo assim reconhecimentos inespecíficos. Os reagentes utilizados neste ensaio foram:

- Tampão de lavagem TBS (1X): NaCl 20mM, Tris 150mM, pH 7,4.
- Tampão de lavagem TBS-T (1X): NaCl 100mM, Tris Base 10mM, Tween 20 0,1% pH 7,4.
- Solução de Bloqueio: TBS-T, e 5% de leite em pó desnatado (Molico)

Os anticorpos primários utilizados foram:

- a) Anti-VEFG-C, Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, EUA);
- b) Anti-COX2, Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, EUA);
- c) Anti-transferrina, Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, EUA).

Após a transferência, foram bloqueadas as membranas com solução de bloqueio. A

solução foi colocada cobrindo a membrana e mantida em agitação suave a temperatura ambiente durante 2:30 horas. Em seguida, a solução de bloqueio foi removida com seis lavagens com TBS-T durante 5 minutos cada. Depois de remover as membranas do tampão de lavagem, estas foram incubadas com a solução do anticorpo primário, durante 4 horas em temperatura ambiente. O anticorpo anti-transferrina foi utilizado como controle endógeno de expressão proteica. A concentração dos anticorpos primários foi de 1:500 para anti-COX-2, 1:3000 para anti-VEGF-C e 1:500 anti-transferrina, diluídos em solução de BSA 5% e TBS-T.

Terminada a incubação, o anticorpo primário foi recuperado e armazenado a -8 °C. As membranas foram lavadas 6 vezes com TBS-T durante 5 minutos a temperatura ambiente. O tampão de lavagem foi removido e a solução de anticorpo secundário anti-rabbit e anti-mouse, de acordo com o anticorpo primário utilizado, foi adicionada em diluições de 1:10000 em TBS-T e leite 5%. A incubação foi feita com agitação suave à temperatura ambiente durante 1 hora. Posteriormente, o anticorpo secundário foi removido e 6 lavagens com TBS-T +5 minutos cada foram realizadas, e 3 lavados com TBS 10 minutos cada.

3.3.6 Revelado e análise das membranas

As membranas foram incubadas com solução de revelado BCIP/NBT kit, Invitrogen (Carlsbad, Califórnia, EUA), até o surgimento das bandas, em uma margem de tempo de 10 a 30 minutos. Posteriormente, as membranas foram analisadas através no aparelho ChemiDoc™ XRS+ System (Biorad, CA, USA) e as bandas das proteínas quantificadas pelo software Image Lab 5.21 (Biorad, CA, USA).

3.4 Citometria de Fluxo

A IL-17A foi dosada em soro (pg/ml) no citômetro de fluxo FACS Aria™, BD (Franklin Lakes, Nova Jersey, EUA) com uso do kit Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17, BD (Franklin Lakes, Nova Jersey, EUA), de acordo com as especificações do fabricante.

3.5 Análise Estatística

Para identificar diferenças estatísticas entre dois grupos foram realizadas análises através do Teste t de Student não-pareado, para mais variáveis foi feita a análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste de Tukey. Valores outliers foram excluídos das análises. Todos os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (SD). O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo para todas as análises.

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando os programas Statistic Package for Social Sciences (SPSS) versão 20.0 e GraphPad Prism 5.

Todos os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão (SD).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo 124 pacientes com CECp e 29 controles atenderam aos critérios previamente estabelecidos de inclusão. A idade média dos pacientes analisados foi de 59,6 anos ($\pm 10,7$), o gênero predominante foi o masculino (79%), a maioria dos pacientes eram tabagistas (54,8%) e não consumiam bebidas alcoólicas (58,9%). Com relação aos aspectos clínicos analisados, o sítio anatômico primário acometido prevalentemente foi a cavidade oral (78,2%), a maior parte dos pacientes se encontrava em estágio avançado da doença (55,7%) e não apresentava metástase em linfonodos regionais (66,1%). Para o grupo controle observou-se uma idade média 57,7 ($\pm 4,02$) com prevalência de homens (82,76%).

As principais características da população analisada como história do uso do tabaco e consumo do álcool, bem como aspectos clínicos estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2- Características clínicas da população analisada.

Variáveis	Pacientes N=124 (%)	Controles N=29 (%)
Idade (Média \pmSD)	59,6 (\pm 10,7)	57,7 (\pm 4,02)
Gênero		
Masculino	98 (79,0)	24 (82,8)
Feminino	26 (21,0)	5 (17,2)
Tabagista		
Sim	68 (54,8)	-
Não	56 (45,2)	-
Etilista		
Sim	51 (41,1)	-
Não	73 (58,9)	-
Sítio anatômico		
Cavidade oral	97 (78,2)	-
Orofaringe	27 (21,8)	-
Linfonodos regionais (N)		
N0	82 (66,1)	-
N+	42 (33,9)	-
Estadiamento		
I/II	55 (44,3)	-
III/IV	69 (55,7)	-

Legenda: N0= sem metástase em linfonodos regionais
 N+= com metástase em linfonodos regionais
 I/II= estadiamento inicial
 III/IV= estadiamento avançado

A predominância de indivíduos do sexo masculino com CECP neste estudo corrobora com dados encontrados na literatura e pode estar relacionada a maior exposição dos homens aos principais fatores de risco associados a doença, como o tabaco e álcool (COLOMBO, 2009; HASHIBE et al., 2007; INCA, 2016).

A idade média dos pacientes deste estudo também tem sido relatada em outros trabalhos, além da prevalência de fumantes, a cavidade oral como sítio anatômico primário mais acometido e o estadiamento avançado da doença, uma vez que a maioria dos pacientes com CECP recebe o diagnóstico já em estágio tardio deste câncer (ALVES et al., 2012; COLOMBO, 2009; INCA, 2016).

O desenvolvimento do CECP é um processo complexo que envolve a exposição a fatores ambientais como o tabagismo, etilismo, poluição e infecção viral, que podem

levar ao acúmulo de variações genéticas e mutações (CHOI; MYERS, 2008). Entretanto, somente uma pequena fração de fumantes e/ou etilistas desenvolvem o CECP, bem como apenas uma parcela dos indivíduos expostos ao HPV vão ter a doença, sugerindo que o surgimento deste câncer também pode ser influenciado pela predisposição genética do paciente e por alterações molaculares (LIU et al., 2017).

4.1 Expressão relativa do mRNA de VEGF-C e COX-2 em tecido tumoral e tecido normal de pacientes com CECP

Das amostras de tecido utilizadas para o estudo, 19 apresentaram quantidade e integridade suficiente de RNA total para proceder com a síntese de cDNA e reação de qPCR para VEGF-C e COX-2. As amostras foram divididas de acordo com o estadiamento clínico dos pacientes (inicial= I/II e avançado= III/IV) e em grupo controle, que corresponde a amostras de tecido normal. O ensaio de qPCR foi realizado em 12 amostras de tecido tumoral e em 5 de tecido normal para VEGF-C, e em 11 amostras de tumor e 4 de tecido normal para COX-2. A expressão relativa do mRNA de VEGF-C e COX-2 foi relacionada ao estadiamento, sexo, metástase em linfonodos regionais, e ao hábito de fumar e beber dos pacientes (tabelas 3 e 4).

A expressão de VEGF-C e COX-2 nos tecidos tumorais e normais é mostrada na figura 7. A expressão relativa do mRNA destes genes não apresentou diferença significativa quando comparados as amostras de tecido normal versus amostras de tumor, além de não haver alteração quando analisado as amostras de tumor subdividas de acordo com o estadiamento clínico (I/II e III/IV) em relação ao tecido normal, apesar de em ambos os casos ser observado uma tendência ao aumento da expressão desses genes em tecido tumoral em relação ao normal. Estes dados podem estar relacionados ao pequeno número amostral em que foi possível se realizar as análises, sendo necessários novos testes com grupos maiores de amostras para se verificar com maior precisão a expressão gênica de VEGF-C e COX-2.

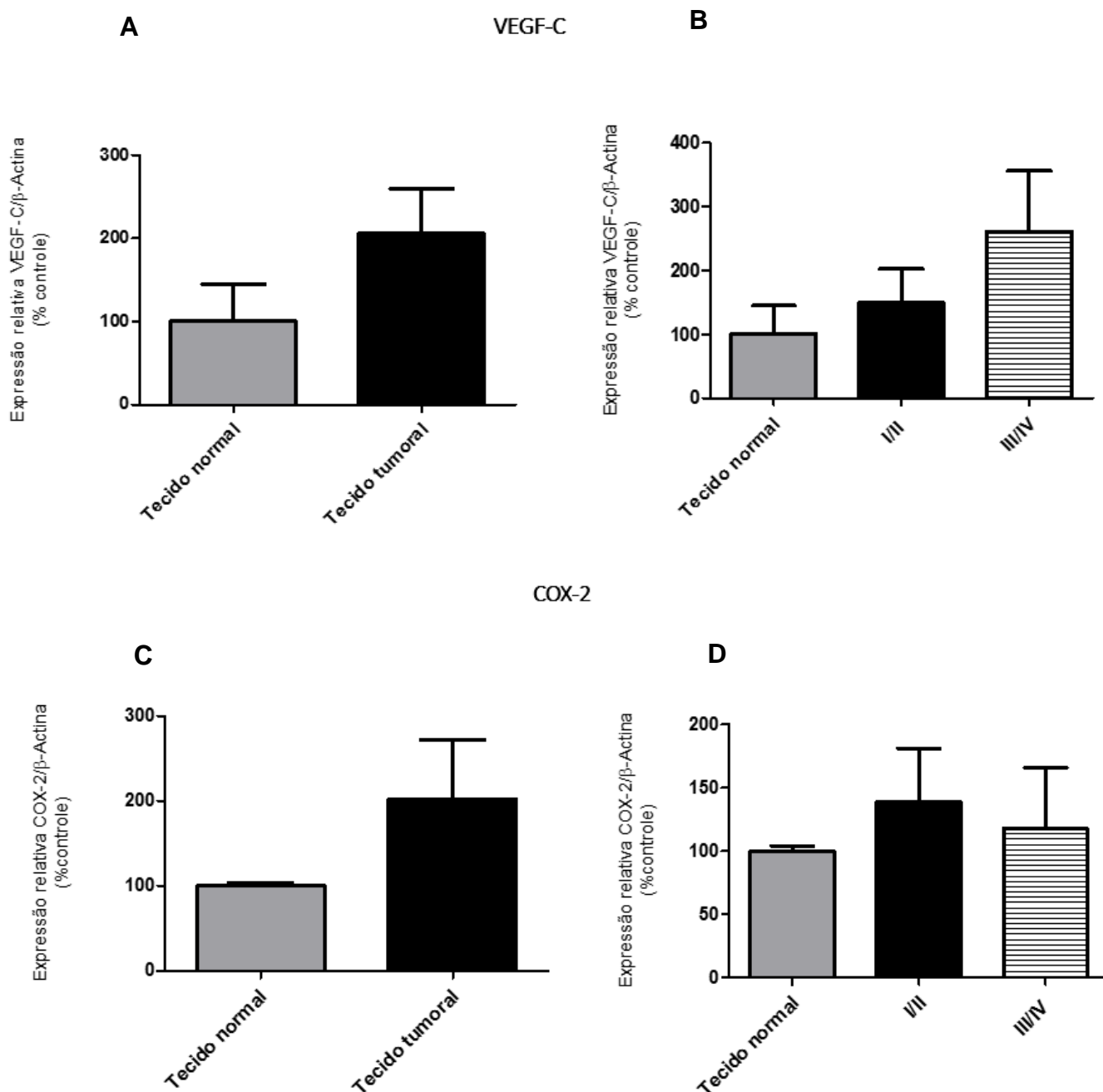


Figura 7. Avaliação da expressão relativa do mRNA de VEGF-C e COX-2 por qPCR com gene normalizador β -actina pelo método $\Delta\Delta Ct$. Análises realizadas em tecido normal e tumoral de indivíduos com CECAP agrupados em estadiamento inicial (I/II) e estadiamento avançado da doença (III/IV). A) Expressão relativa mRNA VEGF-C entre tecido normal (n=5) e amostras de tumor (n=12). B) Expressão relativa do mRNA de VEGF-C em tecido normal (n=5) e em tecido tumoral I/II (n=6); III/IV (n=6). C) Expressão relativa mRNA de COX-2 entre amostras de tecido normal (n=4) e amostras de tumor (n=11). D) Análise da expressão relativa do mRNA de COX-2 em tecido normal (n=4); grupo I/II (n=5); III/IV (n=6). ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey e teste T de Student para comparação entre os grupos. Valores expressos em média \pm SD.

Tanaka e colaboradores, (2010) observaram que a expressão do mRNA de VEGF-C em tecido tumoral foi maior do que em tecido não canceroso em pacientes com câncer de esôfago, além de ser elevada em pacientes com estágio avançado da doença em relação ao grupo em estágio inicial, o que não foi encontrado nas análises realizadas neste estudo.

Embora os resultados não tenham mostrado diferença da expressão de mRNA de COX-2 entre os tecidos tumoral e normal, Moazeni-Roodi et al., (2016) mostraram que o nível da expressão do mRNA de COX-2 em tecidos tumorais era superior a de fragmentos de tecido normal em pacientes com carcinoma oral de células escamosas, além de ser significativamente maior nas amostras provenientes de pacientes em estágio avançado da doença (III/IV) em relação ao estadiamento inicial. Resultados semelhantes foram encontrados por Lee et al., (2015) também em carcinoma oral de células escamosas.

Apesar destes estudos terem mostrado diferenças da expressão do mRNA de VEGF-C e COX-2, os resultados encontrados no presente estudo não permitem afirmar que há uma expressão aumentada do mRNA de VEGF-C e COX-2 nos tecidos tumorais em relação ao tecido normal e nem que o estadiamento avançado do tumor eleva a expressão destes genes.

Com relação aos demais dados clínicos associados a expressão relativa média do mRNA de VEGF-C, observou-se que houve um aumento significativo em amostras de tecido tumoral de pacientes com metástase em linfonodos regionais (N+) ($p=0,027$) (tabela 4), tanto quando comparadas as amostras de tumor de indivíduos sem o envolvimento de linfonodos regionais ($p=0,043$), quanto as amostras de tecido normal ($0,031$) (figura 8). Estes dados evidenciam o papel do VEGF-C no envolvimento linfonodal, e, por conseguinte, no desenvolvimento do CECp.

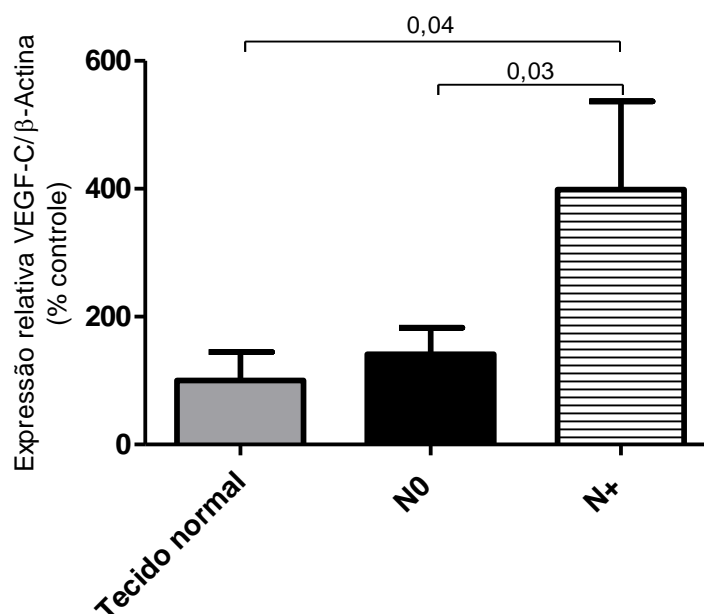


Figura 8. Expressão relativa do mRNA de VEGF-C em amostras de tecido normal (controle n= 5) e amostras de tumor de pacientes sem envolvimento linfonodal (N0, n=9) e com linfonodos regionais (N+, n=3). ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey. Valores expressos em média \pm SD.

No carcinoma epidermóide de língua a expressão de VEGF-C se mostrou como fator de prognóstico para metástase linfonodal no estágio inicial da doença, de acordo com Matsui et al., (2015). Foi observado neste estudo que pacientes com metástases em linfonodos apresentavam maior expressão de VEGF-C do que aqueles pacientes sem envolvimento linfonodal. Além disso, a expressão de VEGF-C mostrou-se como fator prognóstico sobre as taxas de sobrevida específica e sobrevida livre de doença, com pior pronóstico relacionado ao aumento de sua expressão (MATSUI et al., 2015).

Resultados similares foram encontrados por Shintani et al., (2004) onde a comparação entre de tecido tumoral de pacientes com e sem metástase em linfonodos mostrou que o nível de mRNA de VEGF-C tende a ser maior nas amostras de tecido tumoral em que há envolvimento linfonodal no carcinoma oral de células escamosas.

No carcinoma epidermóide de esôfago, a presença de metástases em linfonodos e o aumento da densidade linfonodal também mostrou-se relacionado ao aumento da expressão de mRNA do VEGF-C, além de outros membros da família do VEGF, e da

elevação da expressão desta proteína quando realizadas análises de imunohistoquímica (INOUE et al., 2008).

O crescimento de novos vasos linfáticos, linfagiogênese, é ausente em indivíduos adultos, mas pode ser induzido por processos patológicos como a inflamação, cicatrização de feridas e câncer (ALITALO; DETMAR, 2012). O VEGF-C é conhecido por ser uma molécula crítica para a metástase em linfonodos pela indução da linfagiogênese pela ativação do receptor VEGFR-3 (YU et al., 2014), sendo um preditor da metástase em linfonodos regionais em vários tipos de cânceres, inclusive no CECP (KISHIMOTO et al., 2003).

A metástase em linfonodos é o primeiro sinal da progressão do tumor na maioria das malignidades epiteliais. As células malignas se disseminam pelos vasos linfáticos e podem produzir metástases locorregionais pela proliferação in situ dentro do vaso (ALITALO; DETMAR, 2012). Nos tumores malignos de cavidade oral, a metástase em linfonodos regionais é um importante fator para o tipo de terapia a ser considerada e o prognóstico do paciente (KISHIMOTO et al., 2003). Ademais, linfagiogênese intratumoral é um importante fator de prognóstico independente no carcinoma epidermóide de esôfago (INOUE et al., 2008).

No entanto, devido ao número reduzido de amostras de tumor de pacientes que apresentavam metástase em linfonodos em que foi possível avaliar a expressão relativa do mRNA de VEGF-C neste estudo, é necessário que sejam realizadas mais análises para se estabelecer a relação da expressão deste gene com a metástase de linfonodos regionais de pacientes com CECP e com a progressão da doença.

Os demais dados clínicos-patológicos dos pacientes avaliados neste estudo não demonstraram influenciar na expressão relativa do mRNA VEGF-C, uma vez que nenhuma diferença estatística significativa foi observada (tabela 3).

A expressão relativa do mRNA de COX-2 não apresentou diferença significativa em relação a nenhum dos dados clínicos-patológicos analisados (tabela 4).

Tabela 3- Avaliação da expressão relativa do mRNA de VEGF-C em relação aos dados clínicos-patológicos dos pacientes em tecido tumoral e normal.

Características	Amostras n= 17 (%)	VEGF-C Média \pm SD	p
Gênero			
Masculino	10 (83,3)	238,0 \pm 60,12	0,192 ^a
Feminino	2 (16,7)	42,82 \pm 9,44	
Tabagista			
Sim	6 (50)	189,9 \pm 79,13	0,516
Não	6 (50)	221,1 \pm 81,30	
Tecido normal	5 (100)	100,0 \pm 44,72	
Etilista			
Sim	8 (66,7)	251,6 \pm 108,6	0,434
Não	4 (33,3)	182,4 \pm 64,73	
Tecido normal	5 (100)	100,0 \pm 44,72	
Linfonodos Regionais			
N0	9 (75)	141,1 \pm 41,70	0,027*
N+	3 (25)	398,8 \pm 138,0	
Tecido normal	5 (100)	100,0 \pm 44,72	
Estadiamento			
I/II	6 (50)	149,5 \pm 52,93	0,458
III/IV	6 (50)	12,71 \pm 1,713	
Tecido normal	5 (100)	100,0 \pm 44,72	

ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey. ^aTeste T de Student para comparar médias entre grupos. Valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

Legenda: N0= sem metástase em linfonodos regionais

N+= com metástase em linfonodos regionais

Não foi encontrado dados que evidenciassem a relação da expressão do mRNA de VEGF-C com o histórico do paciente com CECP, como gênero, o hábito de fumar e beber, destacando-se a necessidade de realizar estudos que identifiquem os fatores que influenciam as alterações moleculares no indivíduo com CECP.

Ademais, aspectos moleculares como a presença de polimorfismos de VEGF-C devem ser levados em conta em próximos estudos, uma vez que polimorfismos de um único nucleotídeo tem sido associados a maior susceptibilidade de desenvolver carcinoma oral de células escamosas e carcinoma urotelial celular, estando atrelado ainda ao maior risco de indivíduos que fazem uso de tabaco e álcool (CHIEN et al.,

2013; TUNG et al., 2014).

Os resultados das análises mostram que não há diferença significativa entre a expressão do mRNA de COX-2 quando comparado aos dados clínico-patológicos, conforme tabela 5. Estudos relacionados a expressão do mRNA de COX-2, como Moazeni-Roodi et al.,(2016), também não encontraram diferença significativa do mRNA de COX-2 em tecidos tumorais em relação ao sexo do paciente. No entanto, os autores encontraram que a expressão de COX-2 é elevada em pacientes tabagistas, o que pode estar relacionado as mudanças do epitélio durante a progressão do câncer devido ao hábito de fumar.

Tabela 4- Avaliação da expressão relativa do mRNA de COX-2 em relação aos dados clínicos-patológicos dos pacientes em tecido tumoral e normal.

Características	Amostras n= 15 (%)	COX-2 Média ±SD	p
Gênero			
Masculino	8 (72,7)	140,7 ± 4,01	0,512 ^a
Feminino	3 (27,3)	91,7 ± 44,40	
Tabagista			
Sim	6 (54,5)	123,7 ± 52,52	0,877
Não	5 (45,5)	131,6 ± 34,50	
Tecido normal	4 (100)	100,0 ± 4,12	
Etilista			
Sim	3 (27,3)	130,7 ± 90,10	0,883
Não	8 (72,7)	126,1 ± 32,17	
Tecido normal	4 (100)	100,0 ± 4,12	
Linfonodos Regionais			
N0	8 (72,7)	108,0 ± 29,95	0,463
N+	3 (27,3)	178,9 ± 87,10	
Tecido normal	4 (100)	100,0 ± 4,12	
Estadiamento			
I/II	5 (45,5)	138,9 ± 42,42	0,826
III/IV	6 (54,5)	117,7 ± 48,13	
Tecido normal	4 (100)	100,0 ± 4,12	

ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey. ^aTeste T de Student para comparar médias entre grupos. Valor de p<0,05 foi considerado significativo.

Legenda: N0= sem metástase em linfonodos regionais

N+= com metástase em linfonodos regionais

A enzima COX é limitante na conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas,

das quais duas isoformas foram descritas, COX-1 e COX-2. Como mencionado anteriormente, a COX-1 é constitutivamente expressa em vários tecidos e gera as prostaglandinas necessárias para a função fisiológica normal. Embora a COX-2 não possa normalmente ser detectada, estímulos pró-inflamatórios ou mitogênicos causam sua rápida indução. A COX-2 está envolvida no processo de carcinogênese através de uma gama de mecanismos diferentes, incluindo angiogênese, proliferação celular e prevenção da apoptose. A expressão elevada de COX-2 foi observada em várias malignidades humanas, incluindo carcinomas do cólon, mama, gástrico, brônquico, esofágico e prostático, e no CCP (LEE; KANG; KIM, 2015).

A sobreexpressão de COX-2 tem sido encontrada em diversos tipos de cânceres, incluindo o CECP. Particularmente, um aumento do nível de expressão de COX-2 tem sido identificado no carcinoma oral de células escamosas. Em tumores de indivíduos que apresentam metástase em linfonodos a expressão de COX-2 é elevada, além de estar relacionada a displasia e proliferação das células tumorais (LEE; KANG; KIM, 2015).

Como a COX-2 é inibida por anti-inflamatórios, pode ser que os pacientes incluídos neste estudo no momento da coleta das amostras estivessem fazendo uso deste tipo de medicação, o que pode ter influenciado nos resultados aqui apresentados. Deste modo, é necessário que mais estudos sejam realizados levando em conta este tipo de abordagem, permitindo assim elucidar o papel desta enzima no CECP e os fatores intrínsecos e extrínsecos que interferem em sua expressão. Os AINEs têm sido amplamente utilizados no tratamento de doenças inflamatórias agudas e crônicas, que desempenham os seus efeitos terapêuticos através da inibição da COX-2 para prevenir a produção de prostaglandinas pró-inflamatórias (LEE et al., 2011). Além disso o número de amostras deve ser aumentado para que se possa avaliar de fato se há um aumento de COX-2 nos pacientes com CECP.

4.2 Análise da expressão proteica de VEGF-C e COX-2 em soro de pacientes com CECp e controles

O ensaio de Western Blotting foi realizado em 40 amostras de soro de pacientes com CECp agrupadas de acordo com o estadiamento da doença (I/II e III/IV) e 11 amostras de controle para VEGF-C e COX-2.

Dos dados clínicos-patológicos relacionados a expressão de VEGF-C, observou-se que a expressão média desta proteína foi estatisticamente maior no grupo III/IV (0,01) quando comparado ao grupo I/II ($p= 0,003$) e controle ($p= 0,03$) (figura 9), mostrando que o VEGF-C pode estar relacionado com o pior desfecho da doença e evidenciando seu papel como BM do CECp.

Gênero, Tabagismo, etilismo e metástase em linfonodos regionais não mostraram influência no nível desta proteína nas análises realizadas (tabela 5), destacando-se mais uma vez a relevância de buscar quais fatores influenciam na expressão desta proteína para estabelecer a via pela qual atua na carcinogênese, especialmente do CECp.

A ausência de relação entre a expressão proteica sérica de VEGF-C e o envolvimento de linfonodos foi observada em pacientes com câncer de mama, o que pode estar relacionada com a heterogeneidade da doença, e desta forma influenciando no processo linfagiogênico, dificultando o estabelecimento da via pela qual esta proteína atua na doença (PÉREZ et al., 2015).

Em carcinoma de nasofaringe o nível de VEGF-C em soro de pacientes com CECp é elevado em relação a indivíduos saudáveis, e está relacionado com o estadiamento avançado deste câncer, mostrando a relevância desta proteína como BM de prognóstico da doença e indicativo de metástase das células tumorais (LI, 2015).

No carcinoma de esôfago, o nível sérico de VEGF-C antes do início do tratamento contra a enfermidade é maior em pacientes acometidos pela doença em estágios avançados do que aqueles pacientes que se encontram no início da doença, além de ser elevado em relação ao grupo controle. Os níveis elevados de VEGF-C ainda

têm sido relacionados a metástase em linfonodos, ao tamanho do tumor, metástases distantes e com a menor sobrevida do doente, mostrando-se com um potente indicador de prognóstico da doença (KOZLOWSKI et al., 2010).

Kishimoto et al., (2003) ao estudarem a expressão de VEGF-C em biopsias de pacientes com carcinoma epidermóide de cavidade oral através do uso de imunohistoquímica observaram que o nível desta proteína era superior em indivíduos em estágio inicial da doença (I/II) em relação aos indivíduos em estágio avançado (III/IV). Os autores observaram uma relação no aumento dessa proteína quando os indivíduos apresentavam metástases em linfonodos, o que pode estar relacionado aos diferentes tipos de tecido e técnicas utilizadas neste estudo. Apesar disso, destaca-se mais uma vez a importância do uso do soro para avaliação de BM, já que através deste material biológico pode-se avaliar a condição do doente de forma menos invasiva podendo direcioná-lo a tratamentos mais específicos diminuindo os índices de morbidade.

A expressão aumentada de VEGF-C tem sido associada com sobrevida global reduzida em pacientes com CECP em estágio avançado, levantando a possibilidade de que a avaliação de VEGF-C pode ajudar a identificar pacientes com risco elevado de metástase, podendo dirigi-los para tratamentos mais apropriados (TANIGAKI et al., 2004).

Em linhagem celular de CECP, a sobreexpressão de VEGF-C promove aumento do crescimento e mobilidade de células tumorais quando comparadas a células knockdown para o gene VEGF-C, evidenciando a importância desta proteína na carcinogênese e no processo metastático (BENKE et al., 2010).

Para COX-2, no entanto, não foi notada diferença significativa na sua expressão em nenhum dos grupos analisados (figura 9), nem em relação aos dados clínicos dos pacientes (tabela 6).

A expressão de COX-2 é uma resposta imediata indutível após estimulação pelo soro, promotores de tumores, mitógenos, endotoxinas, citocinas e hormônios. A indução de COX-2 e seu envolvimento com o câncer pode ocorrer através de vários mecanismos, tais como interações com os genes, fatores de crescimento, inflamação e angiogênese. O hábito de fumar é um fator de risco bem conhecido

para os CCP. Substâncias presentes no cigarro podem estimular a transcrição da COX-2, que por sua vez amplifica o efeito de carcinógenos relacionados ao tabaco no início do tumor (DANNENBERG et al., 2001).

Bayazit e colaboradores (2004) em estudo da expressão de COX-2 em carcinoma de laringe de células escamosas não encontraram relação entre a presença de COX-2 com a localização do tumor primário, o estadiamento TNM do paciente, sobrevida e metástase a distância da doença.

De forma contrária, um estudo publicado por Byatnal et al., (2015) mostrou por imunohistoquímica que a sobreexpressão de COX-2 em tecido está significativamente associada com o envolvimento linfonodal, recorrência local do tumor e sobrevida reduzida de pacientes com CECP, mostrando que a expressão de COX-2 representa um BM importante de prognóstico que pode ser usado para identificar pacientes de alto risco e estimar a sobrevida do paciente.

Ainda em contrapartida com os resultados aqui observados, Zhi e colaboradores (2006) observaram que a COX-2 desempenha papel crucial no câncer de esôfago, estando seu aumento relacionado ao aumento da displasia, invasividade e progressão do tumoral.

Levando-se em conta os resultados previamente apresentados neste estudo sobre a expressão relativa de mRNA de COX-2, supõe-se que esta enzima não seja um BM efetivo para avaliação dos pacientes com CECP incluídos neste estudo. Além disso, como a avaliação proteica de COX-2 foi realizada em soro, é possível que o tipo de amostra interfira em sua detecção, sendo necessário mais estudos analisando por diferentes técnicas e tipos de material biológico o perfil desta enzima no CECP. É preciso ainda que sejam incluídos mais parâmetros que possam estar influenciando na expressão desta proteína, como por exemplo o uso de medicação anti-inflamatória pelos pacientes.

Como as proteínas são as principais efetoras dos processos biológicos no organismo, e como a análise da expressão gênica, apesar de fornecer informações relevantes, se torna limitada por diversos fatores, as análises em soro de VEGF-C e COX-2 fornecem uma ferramenta valiosa para avaliação da doença, uma vez que não exige que sejam realizados processos invasivos no paciente para retirada do

material biológico.

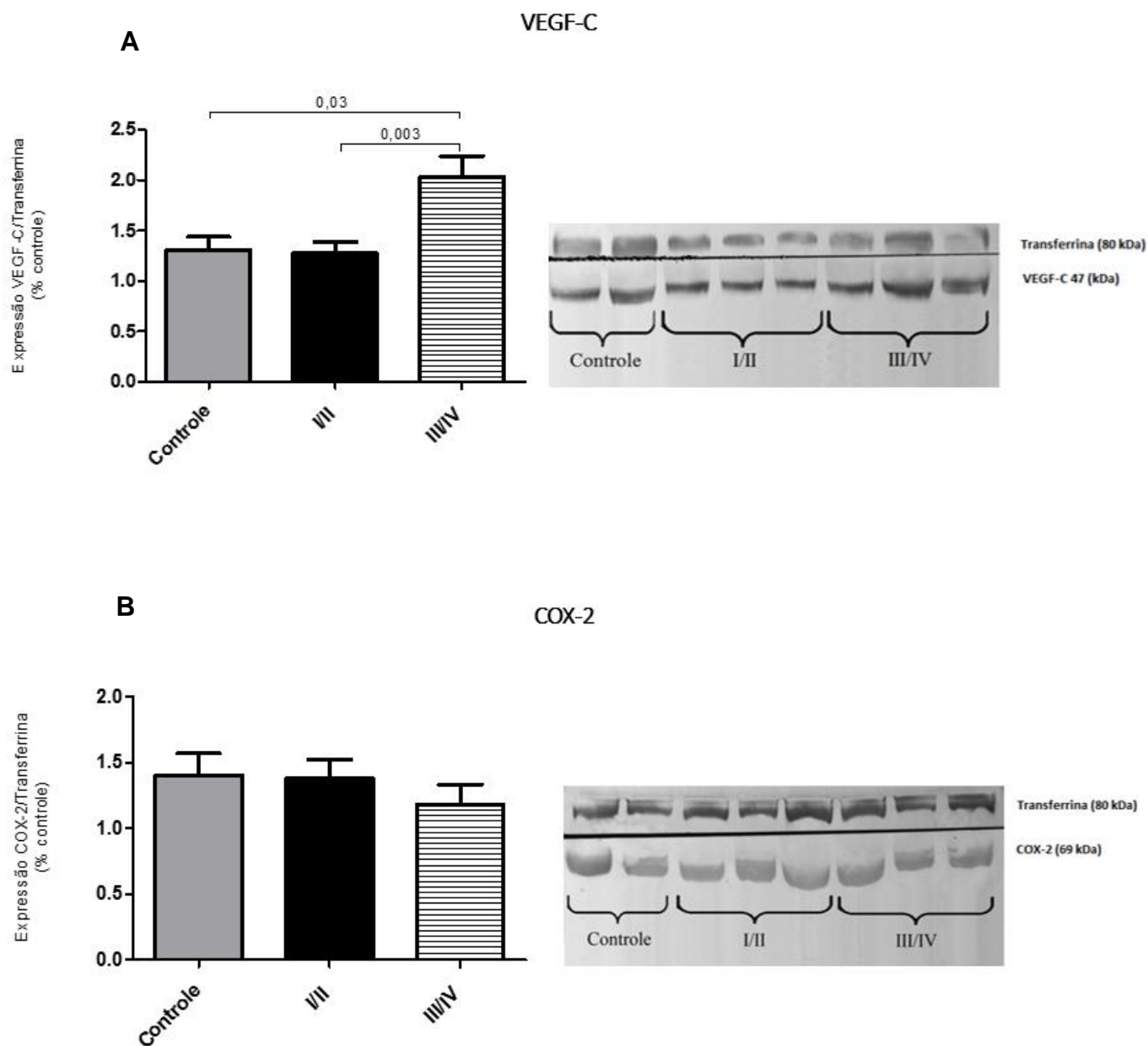


Figura 9. Avaliação da expressão proteica de VEGF-C (A) e COX-2 (B) em soro de indivíduos saudáveis (n=10) e pacientes com CECP em estadiamento inicial (I/II, n= 20) e estadiamento avançado (III/IV, n=19). A proteína sérica transferrina foi utilizada como controle interno. Análises estatísticas realizadas por ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey. Valores expressos em média \pm SD.

Tabela 5- Expressão proteica de VEGF-C em soro em relação aos dados clínicos-patológicos dos pacientes com CECP e controles.

Características	Amostras n= 49 (%)	VEGF-C Média \pm SD	p
Gênero			
Masculino	32 (82,0)	1,44 \pm 0,11	0,144 ^a
Feminino	7 (18,0)	1,91 \pm 0,43	
Tabagista			
Sim	23 (59,0)	1,70 \pm 0,16	0,637
Não	16 (41,0)	1,60 \pm 0,23	
Controle	10 (100)	1,41 \pm 0,16	
Etilista			
Sim	21 (54,0)	1,67 \pm 0,19	0,690
Não	18 (46,0)	1,64 \pm 0,19	
Controle	10 (100)	1,41 \pm 0,16	
Linfonodos Regionais			
N0	27 (69,2)	1,57 \pm 0,17	0,405
N+	12 (30,8)	1,84 \pm 0,21	
Controle	10 (100)	1,41 \pm 0,16	
Estadiamento			
I/II	20 (51,3)	1,27 \pm 0,12	0,01*
III/IV	19 (48,7)	2,03 \pm 0,21	
Controle	10 (100)	1,41 \pm 0,16	

ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey. ^aTeste T de Student para comparar médias entre grupos. Valor de *p<0,05 foi considerado significativo.

Legenda: N0= sem metástase em linfonodos regionais

N+= com metástase em linfonodos regionais

Tabela 6- Expressão proteica de COX-2 em soro em relação aos dados clínicos-patológicos dos pacientes com CECp e controles.

Características	Amostras n= 49 (%)	COX2 Média ±SD	p
Gênero			
Masculino	33 (84,6)	1,31 ± 0,10	0,580
Feminino	6 (15,4)	1,14 ± 0,36	
Tabagista			
Sim	23 (59,0)	1,42 ± 0,12	0,232
Não	16 (41,0)	1,08 ± 0,18	
Controle	10 (100)	1,40 ± 0,16	
Etilista			
Sim	18 (46,0)	1,23 ± 0,14	0,856
Não	21 (54,0)	1,27 ± 0,16	
Controle	10 (100)	1,40 ± 0,16	
Linfonodos Regionais			
N0	27 (69,2)	1,23 ± 0,12	0,655
N+	12 (30,8)	1,40 ± 0,21	
Controle	10 (100)	1,40 ± 0,16	
Estadiamento			
I/II	20 (38,8)	1,40 ± 0,14	0,535
III/IV	19 (40,8)	1,18 ± 0,15	
Controle	10 (100)	1,40 ± 0,16	

ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey. ^aTeste T de Student para comparar médias entre grupos. Valor de p<0,05 foi considerado significativo.

Legenda: N0= sem metástase em linfonodos regionais

N+= com metástase em linfonodos regionais

4.3 Avaliação do nível de IL-17A em soro de pacientes com CECP e controles

Como mencionado anteriormente, a IL-17A possui papel ambíguo em diversos cânceres e no CECP, exercendo tanto atividade pró-tumoral quanto antitumoral. Deste modo, o nível de IL-17A foi dosado em soro de pacientes com CECP e indivíduos saudáveis por citometria de fluxo com intuito de avaliar seu papel neste câncer e sua relevância como BM do CECP.

Foram realizadas dosagens em amostras de soro de 95 pacientes com diagnóstico confirmado do CECP divididos em grupos de acordo com o estadiamento da doença (I/II e III/IV) e 20 controles. Os valores do nível IL-17A foram obtidos em pg/ml. Os resultados obtidos foram relacionados aos dados clínico-patológicos dos pacientes.

Foi observado que o nível de IL-17A em pacientes com CECP é significativamente maior do que em indivíduos saudáveis ($p=0,04$), e está elevado nos estádios iniciais da doença (I/II) ($p=0,03$). Estes dados sugerem que há um aumento da inflamação em pacientes com CECP, especialmente nos estágios iniciais da doença, mostrando que esta citocina pode estar relacionada a progressão deste câncer e que pode ainda ser um útil BM precoce para avaliação da condição do paciente (figura 10).

Dados encontrados por Gaur et al., (2012) no CECP corroboram com estes resultados, uma vez que o nível elevado de IL-17A foi observado nos estágios iniciais da doença em relação aos estadiamentos avançados e ao grupo controle estudados.

Em amostras de soro de pacientes com CECP Li e colaboradores (2011) encontraram resultados semelhantes, onde o nível de IL-17A mostrou-se significativamente maior nos indivíduos com a doença em relação ao grupo controle. No entanto, quando comparados entre os diferentes grupos de estadiamento da doença, foi observado que pacientes em estágio avançado tinham nível superior de IL-17A em relação aqueles no início da doença. Dados similares foram encontrados por Li et al., (2016) em carcinoma de células escamosas de laringe, onde o nível de IL-17A foi maior em pacientes do que o grupo controle e com aumento da citocina em pacientes com estadiamento avançado da doença.

Quando analisados os demais parâmetros clínicos relevados neste estudo, notou-se um aumento significativo da média do nível de IL-17A em pacientes com CECP que eram tabagistas em relação aos indivíduos que não fumavam e ao grupo controle (figura 10), evidenciando a promoção da inflamação no organismo pelo tabaco. De acordo com Yanbaeva et al., (2007) a fumaça do cigarro ativa e libera células inflamatórias na circulação e aumenta a expressão de mediadores inflamatórios como proteínas de fase aguda, fibrinogênio e citocinas pró-inflamatórias, o que pode explicar o aumento da IL-17A nos pacientes fumantes deste estudo.

Pesquisas tem demonstrado que a inflamação crônica é um dos fatores epigenéticos que mais contribuem para o surgimento e progressão do tumor, como por exemplo em indivíduos que apresentam hepatite crônica ou cirrose têm maior risco de apresentar carcinoma hepatocelular e indivíduos com bronquite crônica possuem mais chances de desenvolver câncer de pulmão. Por outro lado, uso crônico de AINES, inibidores da COX-2, reduz a formação tumoral (BRADE; TANNOCK, 2006; CHEN et al., 2007). A inflamação pode auxiliar no desenvolvimento das células tumorais por promover regeneração tecidual contínua, levando a uma maior chance de ocorrência de mutações, e proliferação dessas células mutadas. Além disso, uma microrregião mutagênica pode ser formada através da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio pelas células imunes recrutadas. A resposta inflamatória ainda promove a angiogênese, sendo uma alteração fundamental para o desenvolvimento tumoral (CHAMMAS, 2010).

Curiosamente observou-se ainda que em indivíduos que não apresentavam metástase em linfonodos regionais tiveram um índice superior de IL-17A em relação ao grupo controle, sendo que para aqueles que tinham envolvimento linfonodal não se encontrou alteração significativa do valor médio desta citocina (figura 10). O maior nível de IL-17A em pacientes com CECP sem metástase em linfonodos também foi encontrado por Gaur et al., (2012). Estes dados corroboram sobre a ambiguidade da ação da IL-17A no CECP, uma vez que a ausência de metástases em linfonodos é considerado um fator de melhor prognóstico do paciente, demonstrado que mais estudos são necessários para compreender de fato seu papel na carcinogênese, especialmente neste câncer.

Diversos estudos têm se concentrado nas características e funções da IL-17A em

tumores sólidos, mas a correlação entre o crescimento e progressão tumoral com esta citocina ainda não está completamente elucidada. Por um lado, a IL-17A parece promover atividades anti-apoptóticas e anti-angiogênicas, enquanto por outro ponto de vista esta citocina tem se mostrado relacionada ao aumento da geração de linfócitos T citotóxicos. Entretanto, muitos estudos avaliando o valor prognóstico da IL-17A tem mostrado que esta citocina é benéfica para o crescimento tumoral. Contudo, algumas exceções indicam que um alto nível de IL-17A no tecido tumoral ou no sangue periférico está relacionado a sobrevida prolongada do paciente (CUI et al., 2013; LAN et al., 2013; ZENG et al., 2015).

De acordo com Ye et al., (2013), a atividade pró-tumoral da IL-17A tem sido observada tanto em modelos tumorais de animais quanto em cânceres humanos. Os mecanismos responsáveis envolvem principalmente a angiogênese e a indução de citocinas no microambiente tumoral, resultando no crescimento do tumor. Estudo realizado por Numasaki et al.,(2003) com adenocarcinoma de cólon em modelo animal mostrou os efeitos pró-tumorais da IL-17A, onde esta citocina induzia fatores angiogênicos (VEGF), prostaglandina E2, quimiocinas derivadas de queratinócitos e óxido nítrico a partir dos fibroblastos e das células do tumor.

Como a produção de IL-17A pelas células imunes é dependente de outras citocinas inflamatórias, e como o próprio meio tumoral é rico em citocinas, pode ser que exista interações entre destas moléculas no microambiente do tumoral. Com isso, outros membros da família da IL-17A e outras citocinas podem afetar sua significância funcional em diferentes tipos de canceres, indicando uma possível explicação sobre seu duplo papel na progressão ou supressão do tumor (MALEK-HOSSEINI et al., 2015).

As demais análises relacionadas aos dados clínico-patológicos dos pacientes são apresentadas na tabela 7 e não apresentaram influência significativa no nível de IL-17A.

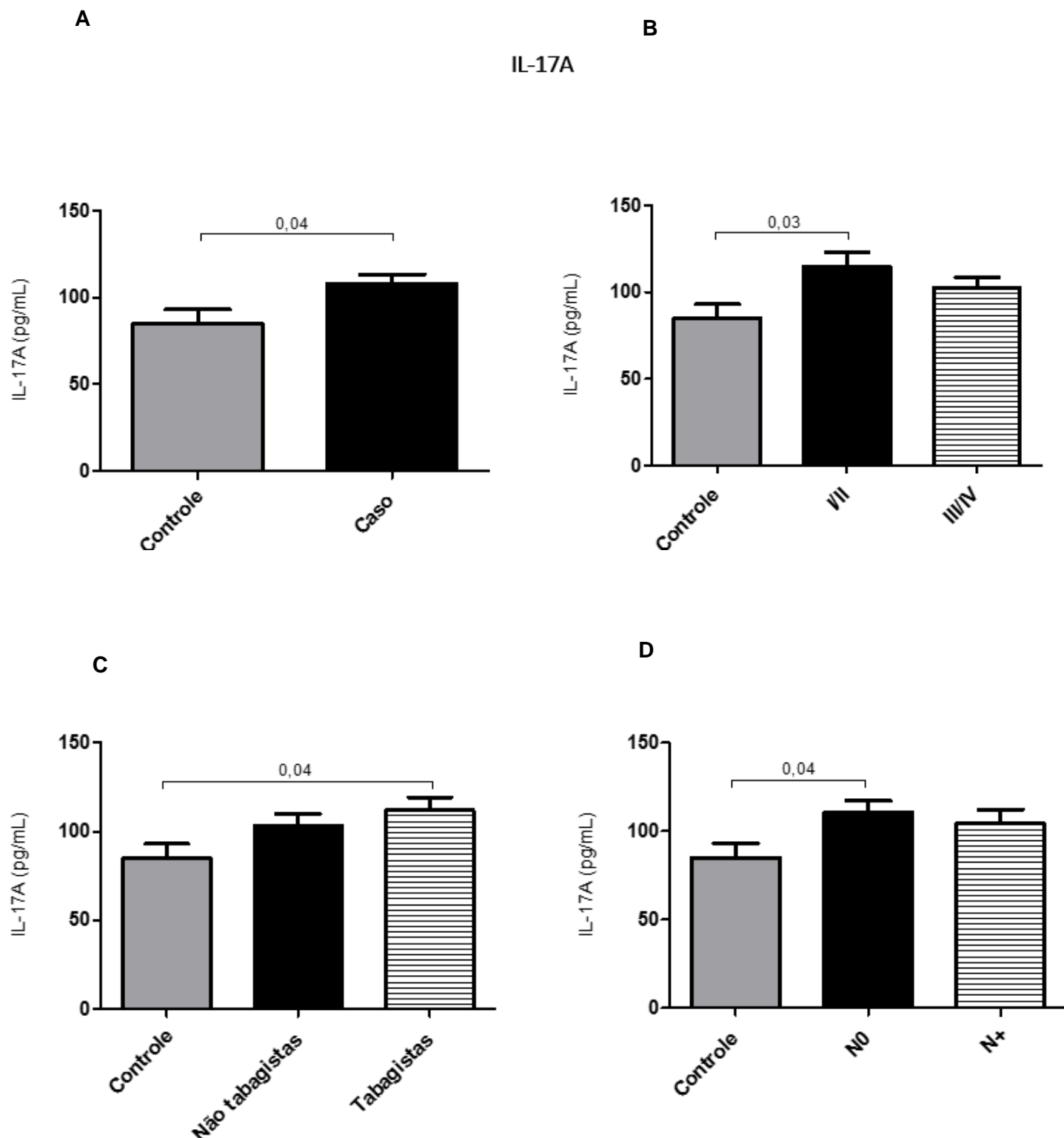


Figura 10. A) Nível de IL-17A entre controles (n=20) e pacientes com CECp (n=95). B) Avaliação de IL-17A em soro de indivíduos saudáveis (n=20) e de pacientes com CECp em estágio inicial (I/II, n=44) e avançado (III/IV, n=51). C) Análise do nível de IL-17A entre grupo controle (n=20), não tabagistas (n=41) e tabagistas (n=54). D) Nível de IL-17A no grupo controle (n=20), pacientes sem envolvimento linfonodal (N0, n=61) e pacientes com metástase em linfonodos regionais (N+, n=34). ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey e teste T de Student para comparação entre os grupos. Valores expressos em média \pm SD.

Tabela 7- Avaliação do nível de IL-17A em relação aos dados clínicos-patológicos dos pacientes com CECP e controles.

Características	Amostras n= 115 (%)	IL-17A Média \pm SD	p
Gênero			
Masculino	78 (82,1)	111,8 \pm 5,75	0,123 ^a
Feminino	17 (17,9)	91,3 \pm 9,80	
Tabagista			
Sim	54 (56,8)	111,9 \pm 7,38	0,100
Não	41 (43,2)	103,2 \pm 6,70	
Controle	20(100)	84,9 \pm 8,18	
Etilista			
Sim	41 (43,2)	107,3 \pm 7,51	0,145
Não	54 (56,8)	108,9 \pm 6,95	
Controle	20(100)	84,9 \pm 8,18	
Linfonodos Regionais			
N0	61 (64,2)	110,5 \pm 6,54	0,121
N+	34 (35,8)	104,0 \pm 8,07	
Controle	20 (100)	84,9 \pm 8,18	
Estadiamento			
I/II	44 (46,3)	114,8 \pm 8,18	0,066
III/IV	51 (53,7)	102,4 \pm 6,30	
Controle	20 (100)	84,9 \pm 8,18	

ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey. ^aTeste T de Student para comparar médias entre grupos. Valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

Legenda: N0= sem metástase em linfonodos regionais

N+= com metástase em linfonodos regionais

5 CONCLUSÕES

A expressão relativa do mRNA de VEGF-C em tecido tumoral de pacientes com CECP que apresentam metástase em linfonodos regionais é elevado em relação aos pacientes que não apresentam envolvimento linfonodal e tecido normal;

A expressão proteica de VEGF-C é maior no soro de pacientes em estágio avançado da doença (III/IV) em relação aos indivíduos em estadiamento inicial (I/II) e controles, o que pode estar relacionado ao pior desfecho dos mesmos;

COX-2 não apresentou diferença significativa em nenhum dos parâmetros e tipos de amostras biológicas analisadas;

O nível de IL-17A é maior nas amostras de soro de estágios iniciais do CECP (I/II), e nos pacientes doentes quando comparados ao grupo controle, sendo um possível BM de prognóstico precoce para o paciente e que pode permitir direcioná-los para tratamentos mais apropriados;

O nível de IL-17A foi estatisticamente superior em pacientes sem envolvimento linfonodal (N0), evidenciando o papel ambíguo que esta citocina exerce no CECP;

Tabagismo mostrou-se relacionado ao aumento do nível de IL-17A, destacando seu papel como fator de risco independente do CECP e na promoção da inflamação;

A análise em soro de paciente com CECP dos BM mostrou-se uma ferramenta valiosa que pode ser utilizada como uma alternativa de avaliação do estado do doente de forma menos invasiva;

VEGF-C e IL-17A são potenciais BM do CECP em soro, sendo uma alternativa viável e de menor invasibilidade para o diagnóstico e prognóstico do paciente. Mais estudos envolvendo análises de sobrevida são requeridos para estabelecê-los como BM de estratégias tanto de direcionamento do tipo de terapia a ser empregada no doente como alvos terapêuticos. Para análise de COX-2 é necessário sua avaliação por outros métodos e levar em conta novas abordagens, como uso de anti-inflamatórios pelo paciente, para estabelecer seu papel como potencial como BM do CECP.

6 REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, S.; GURNEY, A. L. IL-17: prototype member of an emerging cytokine family. **Journal of leukocyte biology**, v. 71, n. 1, p. 1–8, 2002.
- ALITALO, A; DETMAR, M. Interaction of tumor cells and lymphatic vessels in cancer progression. **Oncogene**, v. 31, n. 42, p. 4499–4508, 2012.
- ALVARENGA, L. D. M. et al. Epidemiologic evaluation of head and neck patients in a university hospital of Northwestern São Paulo State. **Brazilian journal of otorhinolaryngology**, v. 74, n. 1, p. 68–73, 2008.
- ALVES, R. et al. Pertinencia de los Factores de Riesgo para el Alcohol y el Tabaco. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 5871111, n. 1011, p. 21–29, 2012.
- BAYAZIT, Y. A. et al. Cyclo-Oxygenase 2 Expression in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma and Its Clinical Correlates. **Orl**, v. 66, n. 2, p. 65–69, 2004.
- BELBIN, T. J. et al. Molecular profiling of tumor progression in head and neck cancer. **Archives of Otolaryngology-Head & Neck Surgery**, v. 131, n. 1, p. 10–18, 2005.
- BENKE, E. M. et al. VEGF-C contributes to head and neck squamous cell carcinoma growth and motility. **Oral Oncology**, v. 46, n. 4, p. e19–e24, 2010.
- BRADY, A. M.; TANNOCK, I. F. Scheduling of radiation and chemotherapy for limited-stage small-cell lung cancer: Repopulation as a cause of treatment failure? **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, n. 7, p. 1020–1022, 2006.
- BYATNAL, A. A. et al. Cyclooxygenase-2 – An Imperative Prognostic Biomarker in Oral Squamous Cell Carcinoma- An Immunohistochemical Study. **Pathology & Oncology Research**, 2015.
- CHAMMAS, R. Câncer e o microambiente tumoral Cancer and the tumor microenvironment. **Revista Médica**, v. 89, n. 1, p. 21–31, 2010.
- CHEN, R. et al. Inflammation, Cancer and Chemoresistance: Taking Advantage of the Toll-Like Receptor Signaling Pathway. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 57, n. 2, p. 93–107, 2007.
- CHIEN, M. H. et al. Impact of VEGF-C Gene Polymorphisms and Environmental Factors on Oral Cancer Susceptibility in Taiwan. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. 1–8, 2013.
- CHOI, S.; MYERS, J. N. Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for therapy. **Journal of dental research**, v. 87, n. 1, p. 14–32, 2008.
- CHUNG, A. S. et al. An interleukin-17-mediated paracrine network promotes tumor resistance to anti-angiogenic therapy. **Nat Med**, v. 19, n. 9, p. 1114–1123, 2013.
- COLOMBO, J. Alterações Genéticas em Câncer de Cabeça e Pescoço Genetic Changes in Head and Neck Cancer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 55, n. 2, p. 165–174, 2009.
- CUI, X. et al. Analysis of CD137l and IL-17 expression in tumor tissue as prognostic indicators for glioblastoma. **International Journal of Biological Sciences**, v. 9, n. 2, p. 134–

141, 2013.

DANNENBERG, A. J. et al. Cyclo-oxygenase 2: A pharmacological target for the prevention of cancer. **Lancet Oncology**, v. 2, n. 9, p. 544–551, 2001.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359–E386, 2014.

FRACON, R. N. et al. Prostaglandins and bone: potential risks and benefits related to the use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in clinical dentistry. **Journal of oral science**, v. 50, n. 3, p. 247–252, 2008.

GAFFEN, S. L. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. **Nature reviews. Immunology**, v. 9, n. 8, p. 556–67, 2009.

GALBIATTI, A. L. S. et al. Head and neck cancer: Causes, prevention and treatment. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 79, n. 2, p. 239–247, 2013.

GALLO, O. et al. Prognostic significance of cyclooxygenase-2 pathway and angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. **Human Pathology**, v. 33, n. 7, p. 708–714, 2002.

GAUR, P. et al. Skewed immunological balance between Th17 (CD4+IL17A +) and Treg (CD4+CD25+FOXP3+) cells in human oral squamous cell carcinoma. **Cellular Oncology**, v. 35, n. 5, p. 335–343, 2012.

GOUT, S.; HUOT, J. Role of cancer microenvironment in metastasis: Focus on colon cancer. **Cancer Microenvironment**, v. 1, n. 1, p. 69–83, 2008.

GREENHOUGH, A. et al. The COX-2/PGE2 pathway: Key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 3, p. 377–386, 2009.

GU, F.-M. et al. IL-17 induces AKT-dependent IL-6/JAK2/STAT3 activation and tumor progression in hepatocellular carcinoma. **Molecular cancer**, v. 10, n. 1, p. 150, 2011.

GUO, R.; JUN, R. Alcohol and acetaldehyde in public health: From marvel to menace. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, n. 4, p. 1285–1301, 2010.

HARRINGTON, L. E. et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. **Nature immunology**, v. 6, n. 11, p. 1123–32, 2005.

HARRIS, R. E. Cyclooxygenase-2 (cox-2) and the inflammogenesis of cancer. **World Journal of Clinical Oncology**, v. 10, n. 5, p. 677–692, 2014.

HASHIBE, M. et al. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: Pooled analysis in the international head and neck cancer epidemiology consortium. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 99, n. 10, p. 777–789, 2007.

HEIDENREICH, A. et al. EAU guidelines on prostate cancer. Part 1: Screening, diagnosis, and treatment of clinically localised disease. **European Urology**, v. 59, n. 1, p. 61–71, 2011.

HIRAKAWA, S. et al. VEGF-C-induced lymphangiogenesis in sentinel lymph nodes promotes

tumor metastasis to distant sites. **Blood**, v. 109, n. 3, p. 1010–1017, 2007.

HISAMATSU, T. et al. The significance of lymphatic space invasion and its association with vascular endothelial growth factor-C expression in ovarian cancer. **Clinical and Experimental Metastasis**, v. 32, n. 8, p. 789–798, 2015.

HULKA BS, GRIFFITH JD, WILCOSKY TC, E. Overview of biological markers in epidemiology. **Oxford University Press**, p. 3–15, 1991.

INCA. **Instituto Nacional do Câncer - Estimativa Incidência de Câncer no Brasil, 2014**. [s.l.: s.n.].

INCA. **Instituto Nacional do Câncer - Estimativa Incidência de Câncer no Brasil, 2016**. [s.l.: s.n.].

INOUE, A. et al. Intratumoral lymphangiogenesis of esophageal squamous cell carcinoma and relationship with regulatory factors and prognosis. **Pathology International**, v. 58, n. 10, p. 611–619, 2008.

JOUKOV, V. et al. Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C. **EMBO Journal**, v. 16, n. 13, p. 3898–3911, 1997.

JÚNIOR, E. S.; ANTÔNIO, C.; NETO, H. Artigo De Atualização Linfonodo Sentinela : Um Novo Conceito No Tratamento Cirúrgico Do Câncer De Mama Sentinel Lymph-Node : a New Concept in Surgical Treatment. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 28, p. 216–222, 2000.

KARKKAINEN, M. J. et al. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. **Nature immunology**, v. 5, n. 1, p. 74–80, 2004.

KARKKAINEN, M. J.; MÄKINEN, T.; ALITALO, K. Lymphatic endothelium: a new frontier of metastasis research. **Nature cell biology**, v. 4, n. January, p. E2–E5, 2002.

KESSELRING, R. et al. Human Th17 cells can be induced through head and neck cancer and have a functional impact on HNSCC development. **British journal of cancer**, v. 103, n. 8, p. 1245–1254, 2010.

KIM, J. G. et al. Prostaglandin synthase 2/cyclooxygenase 2 (PTGS2/COX2) 8473T>C polymorphism associated with prognosis for patients with colorectal cancer treated with capecitabine and oxaliplatin. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 64, n. 5, p. 953–960, 2009.

KIRKBY, N. S. et al. COX-2 protects against atherosclerosis independently of local vascular prostacyclin: Identification of COX-2 associated pathways implicate Rgl1 and lymphocyte networks. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, 2014.

KISHIMOTO, K. et al. Expression of vascular endothelial growth factor-C predicts regional lymph node metastasis in early oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**, v. 39, n. 4, p. 391–396, 2003.

KOLLS, J. K.; LINDÉN, A. Interleukin-17 family members and inflammation. **Immunity**, v. 21, n. 4, p. 467–476, 2004.

KOZLOWSKI, M. et al. Serum vascular endothelial growth factors C and D in patients with oesophageal cancer. **European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the**

European Association for Cardio-thoracic Surgery, v. 38, n. 3, p. 260–7, 2010.

KUNDU, J. K.; SURH, Y. J. Inflammation: Gearing the journey to cancer. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 659, n. 1–2, p. 15–30, 2008.

KYZAS, P. A. et al. Prognostic significance of VEGF immunohistochemical expression and tumor angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 131, n. 9, p. 624–630, 2005.

KYZAS, P. A.; STEFANO, D.; AGNANTIS, N. J. COX-2 expression correlates with VEGF-C and lymph node metastases in patients with head and neck squamous cell carcinoma. **Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc**, v. 18, p. 153–160, 2005.

LAN, C. et al. High density of IL-17-producing cells is associated with improved prognosis for advanced epithelial ovarian cancer. **Cell and Tissue Research**, v. 352, n. 2, p. 351–359, 2013.

LANE, D. et al. Up-regulation of vascular endothelial growth factor-C by nicotine in cervical cancer cell lines. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 53, n. 3, p. 153–158, 2005.

LEE, E. Y.; KANG, J. Y.; KIM, K. W. Expression of cyclooxygenase-2, peroxiredoxin I, peroxiredoxin 6 and nuclear factor- κ B in oral squamous cell carcinoma. **Oncology Letters**, v. 10, n. 5, p. 3129–3136, 2015.

LEE, S. et al. Anti-inflammatory function of arctiin by inhibiting COX-2 expression via NF- κ B pathways. **Journal of inflammation (London, England)**, v. 8, n. 1, p. 16, 2011.

LEPPÄNEN, V.-M. et al. Structural determinants of growth factor binding and specificity by VEGF receptor 2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 6, p. 2425–2430, 2010.

LI, C. et al. Increased prevalence of TH17 cells in the peripheral blood of patients with head and neck squamous cell carcinoma. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 112, n. 1, p. 81–89, 2011.

LI, F.-J. et al. Th17 expression and IL-17 levels in laryngeal squamous cell carcinoma patients. **Acta Oto-Laryngologica**, v. 136, n. 5, p. 484–490, 2016.

LI, R. S. X. W. X. Correlation Analysis of Nasopharyngeal Carcinoma TNM Staging with Serum EA IgA and VCA IgA in EBV and VEGF-C and -D. v. 21, p. 2105–2109, 2015.

LIN, D. T. et al. Cyclooxygenase-2: a novel molecular target for the prevention and treatment of head and neck cancer. **Basic Science Review**, v. 24, n. 8, p. 792–799, 2002.

LIU, G. et al. A novel and cost effective method of removing excess albumin from plasma/serum samples and its impacts on LC-MS/MS bioanalysis of therapeutic proteins. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 16, p. 8336–8343, 2014.

LIU, R. Early Diagnosis of Complex Diseases by Molecular Biomarkers, Network Biomarkers, and Dynamical Network Biomarkers. **Medicinal Research Reviews**, v. 34, n. 3, p. 455–478, 2014.

LIU, Z. et al. Apoptotic capacity and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. **European Journal of Cancer**, v. 72, p. 166–176, 2017.

MALEK-HOSSEINI, Z. et al. IL-17A levels in the sera of patients with gastric cancer show limited Elevation. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 16, n. 16, p. 7149–7153, 2015.

MATSUI, T. et al. Vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) expression predicts metastasis in tongue cancer. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 120, n. 4, p. 436–442, 2015.

MATSUOKA, T.; NARUMIYA, S. Prostaglandin receptor signaling in disease. **TheScientificWorldJournal**, v. 7, p. 1329–47, 2007.

MOAZENI-ROODI, A. et al. Studies on the Contribution of Cox-2 Expression in the Progression of Oral Squamous Cell Carcinoma and H-Ras Activation. **Pathology and Oncology Research**, p. 1–6, 2016.

MOHAMMAD, S. et al. Overexpression of COX-2 in oral squamous cell carcinoma patients undergoing chemoradiotherapy. **National journal of maxillofacial surgery**, v. 2, n. 1, p. 17–21, 2011.

NAYLOR, S. Biomarkers: current perspectives and future prospects. **Expert review of molecular diagnostics**, v. 3, p. 525–529, 2003.

NUMASAKI, M. et al. Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. **Blood**, v. 101, p. 2620–2627, 2003.

OGINO, S. et al. Cyclooxygenase-2 expression Is an independent predictor of poor prognosis in colon cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 24, p. 8221–8227, 2008.

OLOFSSON, B. et al. Current biology of VEGF-B and VEGF-C. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, n. 6, p. 528–535, 1999.

ONISHI, R. M.; GAFFEN, S. L. Interleukin-17 and its target genes: Mechanisms of interleukin-17 function in disease. **Immunology**, v. 129, n. 3, p. 311–321, 2010.

PAI, S. I.; WESTRA, W. H. Molecular Pathology of Head and Neck Cancer: Implications for Diagnosis, Prognosis and Treatment. **Annu. Rev. Pathol.**, v. 4, p. 49–70, 2009.

PENG, J. P. et al. Overexpression of cyclo-oxygenase 2 in squamous cell carcinoma of the hypopharynx. **Human Pathology**, v. 33, n. 1, p. 100–104, 2002.

PÉREZ, D. et al. Correlation between serum levels of vascular endothelial growth factor-C and sentinel lymph node status in early breast cancer. **Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, p. 9285–9293, 2015.

SALIMI, M. et al. Change in nicotine-induced VEGF, PGE2 AND COX-2 expression following COX inhibition in human oral squamous cancer. **Journal of environmental pathology, toxicology and oncology: official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer**, v. 31, n. 4, p. 349–56, 2012.

SCHMIDT, H. et al. The development of a liquid biopsy for head and neck cancers. **Oral Oncology**, v. 61, p. 8–11, 2016.

SHINTANI, S. et al. Expression of vascular endothelial growth factor A, B, C, and D in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**, v. 40, n. 1, p. 13–20, 2004.

SIEGEL, R.; MILLER, K.; JEMAL, A. Cancer statistics , 2015 . **CA Cancer J Clin**, v. 65, n. 1, p. 29, 2015.

STOCKINGER, B.; VELDHOFEN, M. Differentiation and function of Th17 T cells. **Current Opinion in Immunology**, v. 19, n. 3, p. 281–286, 2007.

STUTTFELD, E.; BALLMER-HOFER, K. Structure and function of VEGF receptors. **IUBMB Life**, v. 61, n. 9, p. 915–922, 2009.

SU, J.-L. et al. The role of the VEGF-C/VEGFR-3 axis in cancer progression. **British journal of cancer**, v. 96, n. 4, p. 541–545, 2007.

SVIDER, P. F. et al. Head and Neck Cancer: Underfunded and Understudied? **Otolaryngology-Head and Neck Surgery**, v. 156, n. 1, p. 10–13, 2017.

TANAKA, T. et al. Vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) in esophageal cancer correlates with lymph node metastasis and poor patient prognosis. **Journal of experimental & clinical cancer research : CR**, v. 29, p. 83, 2010.

TANIGAKI, Y. et al. The expression of vascular endothelial growth factor-A and -C, and receptors 1 and 3: correlation with lymph node metastasis and prognosis in tongue squamous cell carcinoma. **Int J Mol Med**, v. 14, n. 3, p. 389–95, 2004.

THOMAS, G. R.; NADIMINTI, H.; REGALADO, J. Molecular predictors of clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma. **Int J Exp Pathol**, v. 86, n. 6, p. 347–363, 2005.

TUNG, M. C. et al. Associations of VEGF-C genetic polymorphisms with urothelial cell carcinoma susceptibility differ between smokers and non-smokers in Taiwan. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, 2014.

URBAN, D. et al. Vascular Endothelial Growth Factor and its Receptor System: Physiological Functions in Angiogenesis and Pathological Roles in Various Diseases. **Journal of Biochemistry**, v. 153, n. 1, p. 13–19, 2012.

WARNER, E. et al. Prospective study of breast cancer incidence in women with a BRCA1 or BRCA2 mutation under surveillance with and without magnetic resonance imaging. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 13, p. 1664–1669, 2011.

WEI, T. et al. Interleukin-17A promotes tongue squamous cell carcinoma metastasis through activating miR-23b / versican pathway. 2016.

WEIDERPASS, E. Lifestyle and cancer risk. **Journal of Preventive Medicine and Public Health**, v. 43, n. 6, p. 459–471, 2010.

YANBAEVA, D. G. et al. Systemic effects of smoking. **Chest**, v. 131, n. 5, p. 1557–1566, 2007.

YE, J.; LIVERGOOD, R. S.; PENG, G. The Role and Regulation of Human Th17 Cells in Tumor Immunity. **The American journal of pathology**, v. 182, n. 1, p. 10–20, 2013.

YOUNG, M. R. I. Th17 Cells in Protection from Tumor or Promotion of Tumor Progression. **Jurnal of Cinical Cell Immunology**, v. 7, n. 3, 2016.

YU, L. et al. E series of prostaglandin receptor 2-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase/activator protein-1 signaling is required for the mitogenic action of

prostaglandin E2 in esophageal squamous-cell carcinoma. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 327, n. 1, p. 258–267, 2008.

YU, T. et al. High interstitial fluid pressure promotes tumor progression through inducing lymphatic metastasis-related protein expressions in oral squamous cell carcinoma. **Clinical and Translational Oncology**, v. 16, n. 6, p. 539–547, 2014.

ZENG, Y. et al. Prognostic significance of interleukin-17 in solid tumors: A meta-analysis. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 8, n. 7, p. 10515–10536, 2015.

ZHANG, F. et al. The overexpression of cyclo-oxygenase-2 in chronic periodontitis. **Journal of the American Dental Association (1939)**, v. 134, n. 7, p. 861–867, 2003.


ZHANG, Q. et al. Nicotine induces hypoxia-inducible factor-1alpha expression in human lung cancer cells via nicotinic acetylcholine receptor-mediated signaling pathways. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 13, n. 16, p. 4686–94, 2007.

ZHANG, Z. et al. Prognostic significance of high VEGF-C expression for patients with breast cancer: An update meta analysis. **PLoS ONE**, v. 11, n. 11, p. 1–15, 2016.

ZHI, H. et al. Significance of COX-2 expression in human esophageal squamous cell carcinoma. **Carcinogenesis**, v. 27, n. 6, p. 1214–1221, 2006.

7 ANEXOS

7.1 ANEXO 1: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Espírito Santo



Comitê de Ética em Pesquisa – CIAS
CENTRO INTEGRADO DE ATENÇÃO A SAÚDE
Unimed Vitória

Vitória, 27 de junho de 2011.
Projeto No: 318/2011
Parecer: 21/2011 ☐ Inicial ☒ Conclusão

Título: Estudo de Câncer de Cabeça e Pescoço no Brasil
Instituição: Hospital Santa Rita de Cássia
Pesquisador: José Roberto V de Podestá
Grupo e Área Temática Especial: IA

Prezado Pesquisador

Após o recebimento e apreciação do projeto e das respostas as pendências formuladas, seguem as observações deste Comitê:

1. Adequar os objetivos de acordo com hipóteses formuladas em linha com a justificativa do projeto.
Parecer do CEP: pendência atendida
2. Incluir, na metodologia os critérios de seleção (inclusão e exclusão) amostral assim como características outras que sejam pertinentes. Explicitar, ainda na metodologia, o estudo piloto, e sua metodologia.
Parecer do CEP: Pendência atendida. O estudo piloto não foi contemplado na metodologia, mas é citado na página 17.
3. Justificar ausência do cálculo amostral
Parecer do CEP: Pendência atendida. É citado na página 10 (metodologia) que a amostra será de conveniência.
4. Adequar o TCLE à CNS 347/05 de Janeiro 2005 e incluir campos para identificação de quem aplicou o TCLE. É direito inalienável do sujeito de pesquisa saber ou não querer saber sobre seus resultados de exames realizados em sua propriedade biológica, tenha ou não aplicabilidade clínica. Pede-se, portanto, para rever a informação sobre o tema no TCLE.
Parecer do CEP: pendência atendida. TCLE devidamente adequado e, sobe nossa avaliação, dentro dos critérios éticos e alinhados com a resolução 196/1996 e suas complementares.

Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos – CIAS Unimed Vitória
Av. Leito da Silva, 2311, Bairro Itararé Vitória (ES) CEP: 29047-575 – 27 3335-5348 cep@unimedvix.com.br

Página 1 de 2



Comitê de Ética em Pesquisa – CIAS
CENTRO INTEGRADO DE ATENÇÃO A SAÚDE
Unimed Vitória

5. Corrigir o cronograma

Parecer do CEP: pendência atendida. Cronograma corrigido.

6. Incluir Declarações de Infraestrutura de todas as instituições hospitalares participantes, inclusive a do Hospital que assina a Folha de Rosto.

Parecer do CEP: pendência atendida. Declarações entregues.

7. Informar no dossiê se as amostras biológicas permanecerão identificadas e no país ou se serão exportadas e/ou desvinculadas dos respectivos sujeitos.

Parecer do CEP: pendência atendida

CONCLUSÃO

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa acima citado, foi considerado:

APROVADO

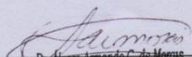
É parecer desse comitê que o referido projeto e demais documentos apresentados, **atende** aos aspectos da Resolução **CNS 196/96** e complementares, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos. Estamos aguardando o parecer final da CONEP.

Foram aprovados os seguintes documentos:

- Projeto de pesquisa versão de 1º de abril de 2011;
- Declaração de infraestrutura versão 27 de abril de 2011;
- Respostas as pendências versão 27 de abril de 2011;

O primeiro relatório de andamento do projeto deverá ser encaminhado a este CEP até o dia 27 de dezembro de 2011.

Atenciosamente,


Dr. Álvaro Armando Carneiro de Moraes
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa em
Seres Humanos do CIAS